

**Untersuchungen zur Topologie  
der Synthese von Lipiden der äußeren  
Membran von Escherichia coli**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie  
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

**HERMANN JOSEF LEYING**

**Bochum 1988**



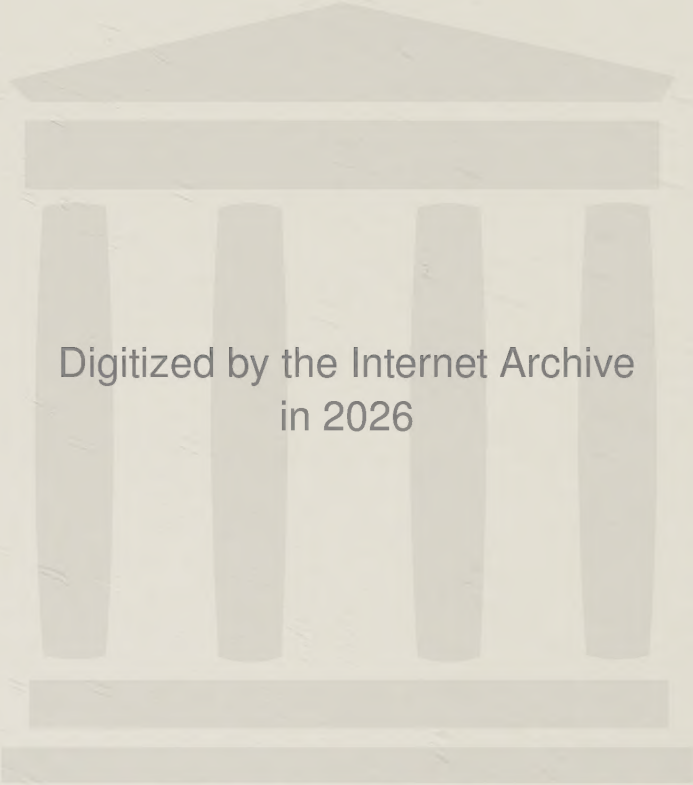
Untersuchungen zur Topologie  
der Synthese von Lipiden der äußeren  
Membran von *Escherichia coli*

DIREKTION

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität  
zu Köln

von  
HANS-JOachim LEHME

Köln, 1988



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

**Untersuchungen zur Topologie  
der Synthese von Lipiden der äußeren  
Membran von Escherichia coli**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie  
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

**HERMANN JOSEF LEYING**

Bochum 1988

Referent:

Prof. Dr. W. Opferkuch

Koreferent:

Prof. Dr. W. Hengstenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 18.4.1988

Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch habe ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Raumes, für den freundliche Aufnahme zu dieser Arbeit und für die großzügige Unterstützung, die mir jederzeit gewährte.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Dr. G.-E. Kraft wegen der, Herrschaft. Er hat mir für die Arbeit wichtige Hinweise gegeben und mir diese viele wertvolle, nützliche Ratschläge und wertvolle Kritik sehr zufließen.

Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch habe ich für die Überlassung des Raumes dankend.

Herrn Dr. G.-E. Kraft wegen der, Herrschaft. Er hat mir für die Arbeit wichtige Hinweise gegeben und mir diese viele wertvolle, nützliche Ratschläge und wertvolle Kritik sehr zufließen.

Herrn Herrn Herrschaft. Herrschaft. Er hat mir für die Arbeit wichtige Hinweise gegeben und mir diese viele wertvolle, nützliche Ratschläge und wertvolle Kritik sehr zufließen.

Herrn Dr. Kraft und Herrn Dr. Opferkuch habe ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Raumes dankend.

Die vorliegende Arbeit wurde an der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch angefertigt.



Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für das fördernde Interesse an dieser Arbeit und für die großzügige Unterstützung, die er mir jederzeit gewährte.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Dr. H.-P. Kroll (Bayer AG, Wuppertal). Er hat mir für die Arbeit wichtige Anregungen gegeben und mir durch viele Ratschläge, fördernde Diskussionen und freundliche Kritik sehr geholfen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Gmeiner danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Herrn Dr. W.-H. Voigt (Bayer AG, Wuppertal) danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der elektronenoptischen Aufnahmen.

Für ihre Diskussionsbereitschaft und ihr Interesse an meiner Arbeit danke ich besonders Herrn Dr. K.-H. Büscher und Herrn S. Suerbaum.

Frau S. Wendt und Frau B. Andres gilt mein aufrichtiger Dank für die sachkundige Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.



## Inhaltsverzeichnis

|         |                                                                            |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.      | <u>Einleitung</u>                                                          | 1  |
| 1.1     | Ultrastruktur der Zellhülle                                                | 1  |
| 1.2     | Chemische Zusammensetzung und wichtige Funktionen und Eigenschaften der CM | 3  |
| 1.3     | Das Peptidoglykan                                                          | 6  |
| 1.4     | Die äußere Membran                                                         | 8  |
| 1.4.1   | Struktur und chemische Zusammensetzung der äußeren Membran                 | 8  |
| 1.4.2   | Aufbau und Funktion der wichtigsten Bausteine der äußeren Membran          | 9  |
| 1.4.2.1 | Die Proteine                                                               | 9  |
| 1.4.2.2 | Das Lipopolysaccharid                                                      | 13 |
| 1.4.2.3 | Die Lipide                                                                 | 15 |
| 1.4.3   | Funktionen und Eigenschaften der äußeren Membran                           | 15 |
| 1.5     | Der periplasmatische Raum                                                  | 17 |
| 1.6     | Chemie und Biosynthese der Membranbausteine                                | 17 |
| 1.6.1   | Die Proteine                                                               | 17 |
| 1.6.2   | Das Lipopolysaccharid                                                      | 20 |
| 1.6.3   | Die Phospholipide                                                          | 23 |
| 1.7     | Topologie der Biosynthese der Bausteine der äußeren Membran                | 27 |
| 1.8     | Problemstellung                                                            | 31 |
| 2.      | <u>Material und Methoden</u>                                               | 34 |
| 2.1     | Material                                                                   | 34 |
| 2.1.1   | Chemikalien                                                                | 34 |

|           |                                                                      |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.2     | Radioaktive Verbindungen                                             | 34 |
| 2.1.3     | Antibiotika                                                          | 34 |
| 2.1.4     | Puffer                                                               | 35 |
| 2.1.4.1   | HEPES-Saccharose-Lysozym-Puffer                                      | 35 |
| 2.1.4.2   | Probenpuffer für die Gelelektrophorese                               | 35 |
| 2.1.4.3   | Elektrodenpuffer für die Gelelektrophorese                           | 35 |
| 2.1.5     | Lösungen                                                             | 36 |
| 2.1.5.1   | Lösung für die Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen         | 36 |
| 2.1.5.2   | Entfärbelösung für Polyacrylamidgele                                 | 36 |
| 2.1.6     | Nährmedien                                                           | 36 |
| 2.1.7     | Bakterien                                                            | 37 |
| 2.2       | Methoden                                                             | 37 |
| 2.2.1     | Analytische Methoden                                                 | 37 |
| 2.2.1.1   | Bestimmung von Protein, KDO und Phospholipidphosphat                 | 37 |
| 2.2.1.2   | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                      | 38 |
| 2.2.1.3   | Enzymbestimmungen                                                    | 38 |
| 2.2.1.3.1 | Messung der NADH-Oxidase-Aktivität                                   | 38 |
| 2.2.1.3.2 | Messung der D-Lactat-, Glucose- und Succinat-Dehydrogenase-Aktivität | 39 |
| 2.2.1.3.3 | Messung der 5'-Nucleotidase-Aktivität                                | 39 |
| 2.2.1.4   | Fettsäureanalyse                                                     | 39 |
| 2.2.1.4.1 | Vorbereitung des Probenmaterials                                     | 39 |
| 2.2.1.4.2 | Bedingungen und Auswertungen der gaschromatographischen Analyse      | 40 |
| 2.2.1.5   | Elektronenoptische Untersuchungen                                    | 41 |
| 2.2.1.6   | Bestimmung der MHK                                                   | 41 |

|         |                                                                                                                                      |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.2   | Präparative Methoden                                                                                                                 | 41 |
| 2.2.2.1 | Extraktion von LPS und Phospholipiden                                                                                                | 41 |
| 2.2.2.2 | Zerstörung der Bakterien                                                                                                             | 42 |
| 2.2.2.3 | Isolierung und Auftrennung von Membrangemischen                                                                                      | 43 |
| 2.2.3   | "Pulse-chase"-Markierung von Bakterien mit [2- <sup>3</sup> H]Glycerin                                                               | 44 |
| 2.2.4   | Analyse des <sup>3</sup> H-markierten Materials                                                                                      | 45 |
| 3.      | <u>Ergebnisse</u>                                                                                                                    | 47 |
| 3.1     | Untersuchung der Effizienz der Zellzerstörung durch osmotischen Schock                                                               | 47 |
| 3.2     | Auftrennungen von Membrangemischen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation                                                    | 51 |
| 3.3     | Identifizierung der durch isopyknische Saccharosedichtegradientenzentrifugation voneinander getrennten Membranfraktionen             | 55 |
| 3.3.1   | EM- Untersuchung                                                                                                                     | 55 |
| 3.3.2   | SDS-PAGE                                                                                                                             | 57 |
| 3.3.3   | Markerenzyme der CM                                                                                                                  | 60 |
| 3.3.4   | Solubilisierbarkeit mit Sarkosyl                                                                                                     | 63 |
| 3.3.5   | Die quantitative Zusammensetzung der Membranfraktionen aus LPS, Phospholipiden und Protein                                           | 65 |
| 3.3.6   | Zusammenfassung der Ergebnisse zur Auftrennung von Membrangemischen                                                                  | 69 |
| 3.4     | Die Dichtegradientenverteilungen markierter und unmarkierter Membranbruchstücke von [2- <sup>3</sup> H]Glycerin-markierten Bakterien | 71 |
| 3.4.1   | "Pulse-chase"-Markierung der Bakterien und Zellzerstörung durch Anwendung unterschiedlicher Methoden                                 | 72 |
| 3.4.2   | "Pulse-chase"-Markierung von antibiotikumvorinkubierten Bakterien und Zellzerstörung durch osmotischen Schock                        | 75 |



|         |                                                                                                                                                                                    |     |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4.2.1 | Dichtegradientenverteilung der Membranen                                                                                                                                           | 75  |
| 3.4.2.2 | Die Zusammensetzung der äußeren Membran                                                                                                                                            | 81  |
| 3.4.3   | Kontinuierliche Markierung über Nacht und Zellzerstörung durch osmotischen Schock                                                                                                  | 85  |
| 3.4.4   | Kontinuierliche Markierung über Nacht, Rekultivierung in kaltem Medium und Zellzerstörung durch osmotischen Schock                                                                 | 86  |
| 3.4.5   | Kontinuierliche Markierung unter Verwendung unterschiedlicher Aktivitäten bzw. spezifischer Aktivitäten und Zellzerstörung durch osmotischen Schock                                | 88  |
| 3.4.6   | Doppelmarkierung mit $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$ und $\text{L}-[U-^{14}\text{C}]\text{Aminosäuren}$ und Zellzerstörung durch osmotischen Schock                                | 94  |
| 3.4.7   | Isolierung und Trennung von Membranbruchstücken bei $25^\circ\text{C}$                                                                                                             | 97  |
| 3.4.8   | "Pulse-chase"-Markierung der Bakterien und Zellzerstörung durch Anwendung der MD-Methode                                                                                           | 100 |
| 3.5     | Dichtegradientenverteilungen der Membranbruchstücke $[2-^3\text{H}]$ - und $[U-^{14}\text{C}]\text{Glycerin}$ markierter, mit Glycerin als Kohlenstoffquelle gewachsener Bakterien | 103 |
| 3.5.1   | $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$ -Markierung der Bakterien                                                                                                                          | 104 |
| 3.5.2   | $[U-^{14}\text{C}]\text{Glycerin}$ -Markierung der Bakterien                                                                                                                       | 106 |
| 3.6.    | Untersuchung des radioaktiv markierten Materials auf methanol- und chloroformlösliche Anteile                                                                                      | 106 |
| 3.7     | Die Fettsäure-Substitution der in den Membranfraktionen enthaltenen Lipide                                                                                                         | 110 |
| 4.      | <u>Diskussion</u>                                                                                                                                                                  | 113 |
| 5.      | <u>Zusammenfassung</u>                                                                                                                                                             | 127 |
| 6.      | <u>Literaturverzeichnis</u>                                                                                                                                                        | 131 |

## Verzeichnis der Abkürzungen

|         |                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------|
| AS      | Aminosäure                                            |
| ATP     | Adenosintriphosphat                                   |
| CM      | Cytoplasmamembran                                     |
| CMP     | Cytidinmonophosphat                                   |
| CTP     | Cytidintriphosphat                                    |
| DAP     | Diaminopimelinsäure                                   |
| EDTA    | Ethylendiamintetraacetat                              |
| HEPES   | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure       |
| KDO     | 2-Keto-3-deoxy-Octonsäure                             |
| LPS     | Lipopolysaccharid                                     |
| MHK     | Minimale Hemmkonzentration                            |
| NAD(P)H | reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat) |
| OD      | Optische Dichte                                       |
| OM      | Äußere Membran                                        |
| PAGE    | Polyacrylamidgelelektrophorese                        |
| PL-P    | Phospholipidphosphat                                  |
| RT      | Raumtemperatur                                        |
| SDS     | Natriumdodecylsulfat                                  |
| UDP     | Uridindiphosphat                                      |



## 1. **Einleitung**

Zum besseren Verständnis der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse erscheint es sinnvoll, dem Leser zunächst einen Überblick zu geben über die räumliche Anordnung und Zusammensetzung der Zellhüllstrukturen gramnegativer Bakterien und über den chemischen Aufbau und die Biosynthese der wichtigsten Membranbausteine. Vor dem Hintergrund dieser Informationen sollen dann von verschiedenen Autoren veröffentlichte Befunde, die zum Verständnis der bisher noch sehr im dunkeln liegenden Topologie der Biosynthese von Proteinen, LPS und Phospholipiden der äußeren Membran (OM) beitragen können, dargestellt werden.

### 1.1 **Ultrastruktur der Zellhülle**

Lange vor der Benutzung von Elektronenmikroskopen war bekannt, daß Bakterien eine Zellwand besitzen. Jedoch ermöglichte die Anwendung von Zellwandfärbemethoden in Verbindung mit Lichtmikroskopie über die Aussage hinaus, daß eine Zellwand vorhanden war, kaum Informationen über den Feinbau der Zellhülle. Erst die Präparation von Ultradünnschnitten von Bakterien, mit der um 1950 (4, 23) begonnen wurde, die spätere Anwendung der Negativkontrastierung mit Molybdat und Phosphorwolframsäure sowie die Weiterentwicklung der Methoden zur Präparation, Einbettung, Fixierung und Anfär-

bung von Bakterien, gleichzeitig mit der Erhöhung der Auflösungsmöglichkeiten von Elektronenmikroskopen, haben Einblicke in die Ultrastruktur biologischen Materials, insbesondere auch der Zellhülle von Bakterien erlaubt.

In den ersten Arbeiten zur Ultrastruktur der Zellhülle von Escherichia coli wurden vier Schichten unterschieden: a) die Cytoplasmamembran (CM), die eine Einheit aus drei Schichten zu bilden schien, b) eine dünne Peptidoglykanschicht, c) eine relativ unstrukturierte Zone, und d) eine äußere Membran, die im elektronenmikroskopischen Bild, ebenso wie die CM als dreischichtige Einheitsmembran erschien. In Abb. 1 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Längsschnittes durch Escherichia coli dargestellt mit der charakteristischen Schichtung der Zellwand gramnegativer Bakterien. Die Trennung und Isolierung von OM und CM in beachtlich homogenem Zustand gelang 1968 durch Miura und Mizushima (103). Die von ihnen angewendete Methode bildete die Basis für viele weitere Modifikationen (41, 127, 174). Damit war eine differenzierte biochemische Analyse der Zellhülle gramnegativer Bakterien möglich.

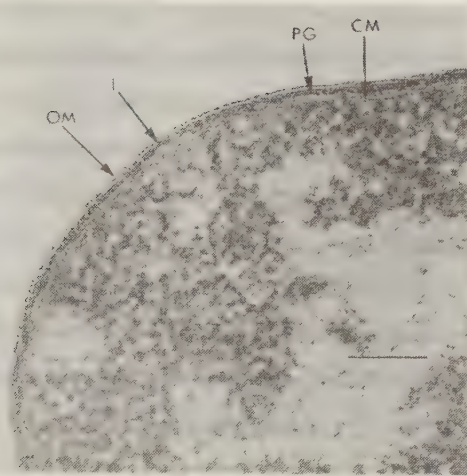


Abb.1: Ein Längsschnitt durch Escherichia coli zeigt die charakteristische Schichtung der Zellwand von gramnegativen Bakterien.  
OM = Äußere Membran  
I = Periplasmatischer Raum  
PG = Peptidoglykan  
CM = Cytoplasmamembran  
Die Markierung entspricht 0,1  $\mu\text{m}$ .  
Aus (20)

## 1.2 Chemische Zusammensetzung und wichtige Funktionen und Eigenschaften der CM

Wie die Membranen aus anderen Zellen besteht auch die CM von Bakterien im wesentlichen aus Phospholipiden und einem Spektrum von Proteinen. Jedoch im Gegensatz zur CM von eukaryontischen Zellen besitzt die CM von Bakterien keine Sterole und auch sonst ein engeres Lipidspektrum. Mehr als

90% der in Bakterien enthaltenen Lipide sind in der CM und OM lokalisiert. Die am weitesten verbreiteten Lipidspezies sind Phosphatidylethanolamin, das bei gramnegativen Bakterien in der Regel den quantitativ bedeutendsten Anteil ausmacht, Phosphatidylglycerin und Diphosphatidylglycerin, das auch als Cardiolipin bezeichnet wird. Sphingolipide und Phosphatidylinositol, die in eukaryontischen Membranen häufig nachgewiesen werden, kommen bei Bakterien mit wenigen Ausnahmen, wie z.B. Mykobakterien, Propionibakterien, Corynebakterien und Micrococcus luteus (94, 132) nicht vor. Bei gramnegativen Bakterien unterscheiden sich die OM und CM in der Phospholipidzusammensetzung. Obgleich sie generell dieselben Phospholipidspezies enthalten, ist der Gehalt der OM an Phosphatidylglycerin und Cardiolipin niedriger, und der Anteil an Phosphatidylethanolamin liegt höher als der der CM (127, 149).

Verschieden von eukaryontischen Zellen ist auch die Fettsäuresubstitution der bakteriellen Lipide. So gibt es zum Beispiel bei Prokaryonten keine mehrfach ungesättigten Fettsäuren (135), mit Ausnahme von Mycobacterium phlei (3). Bei Escherichia coli dominieren mit jeweils 25 - 40% der Gesamtfettsäuren Palmitinsäure (C16:0), Palmitoleinsäure (C16:1), Ölsäure (C18:1), Cyclopropanfettsäuren mit bis zu 20% und Laurin- (C12:0) und Myristinsäure (C14:0) mit bis zu 5% (26, 27). In der Regel dominieren C16-Fettsäuren (28). Bei niedrigeren Temperaturen werden jedoch zu einem

größeren Teil ungesättigte Fettsäuren eingebaut (98, 164). Die Cyclopropanderivate von Palmitolein- und Ölsäure kommen bei stationären und langsam wachsenden Zellen stärker vor (27, 164). Die Fettsäuresubstitution der einzelnen Phospholipidspezies ist sehr ähnlich (77).

Im Gegensatz zur CM eukaryontischer Zellen besitzen bakterielle Membranen mit 50 - 70% Protein und 20 - 30% Lipid im Vergleich zu anderen Membranen - bei Mikrofungi z.B. 40 - 45% Protein, 40 - 45% Lipid (135) - ein größeres Protein/Lipid-Verhältnis. Dies leuchtet ein unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die CM von Bakterien in der Regel alle Membranfunktion ausüben muß, die bei Eukaryonten auf mehrere Membransysteme und Organellen wie z.B. endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien verteilt sind.

Die physikalischen Eigenschaften der CM ergeben sich aus ihrer Struktur. Allgemein akzeptiert wird das Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson (165), nach dem die Lipidmoleküle eine Doppelschicht bilden, indem sich die Kohlenhydratketten der Fettsäuren einander zuwenden und der geladene Rest nach außen zur wäßrigen Umgebung gerichtet ist. In die Doppelschicht sind Proteine eingelagert. Sowohl Lipidmoleküle als auch Proteine besitzen eine ausgesprochen hohe laterale Mobilität, wobei für Lipidmoleküle eine Mobilität von  $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$  (dies bedeutet, daß Lipidmoleküle eine Bakterienzelle in 1 - 2 Sekunden durchqueren können

(80) ). Membranproteine besitzen Mobilitäten, die etwa um den Faktor 100 niedriger liegen als die von Lipiden (153). Im Gegensatz zur lateralen erfolgt die transversale Bewegung von Lipidmolekülen und Proteinen durch die Membran, wenn überhaupt, dann nur extrem langsam (87, 169).

Die bakterielle CM muß i.a. Funktionen übernehmen, für die eukaryontische Zellen spezielle Organellen besitzen. Sie ist deshalb im wahrsten Sinne des Wortes multifunktionell, und ihre Aufgaben sollen in diesem Zusammenhang nur kurz umrissen werden. Die CM spielt eine zentrale Rolle bei der Erzeugung der für die Zelle allgemein nutzbaren Energie in Form von ATP. Ein Großteil ihrer Proteine ist Bestandteil von Elektronentransportketten. Sie stellt eine Permeabilitätsbarriere der Zelle dar. Transportsysteme kontrollieren die Aufnahme und Abgabe von Metaboliten und Ionen. Die Lipiddoppelschicht ist impermeabel für hydrophile Moleküle. Die CM besitzt darüber hinaus wichtige Aufgaben bei der Synthese von Zellhüllkomponenten.

### 1.3      **Das Peptidoglykan**

Das Peptidoglykan ist ein Haupt-Zellwand-Polymer von Eubakterien. Untersuchungen zur chemischen Struktur des Peptidoglykans führten zur Unterscheidung von fast 100 verschiedenen Typen (155, 156). Dabei ist der Glykananteil der ver-

schiedenen Varianten ziemlich einheitlich. Er besteht in der Regel aus alternierenden N-acetylierten  $\beta$ -1,4- glykosidisch verbundenen Resten von Glukosamin und dem entsprechenden Lactylether-Derivat Muraminsäure, wobei etwa 100 - 180 Disaccharideinheiten (186) zu Ketten verbunden sind. Die Zuckerketten wiederum sind durch Peptidbrücken, die an die Carboxylgruppen der Muraminsäurereste binden, quervernetzt. Jeweils 2 Einheiten, die über die freie  $\text{NH}_2$ -Gruppe einer basischen Aminosäure (z.B. Diaminopimelinsäure) und die freie Carboxylgruppe der endständigen Aminosäure einer benachbarten Kette verbunden sind, bilden dabei die Peptidverbindung. Das so aus miteinander verbundenen Polysaccharidketten gebildete Netzwerk schützt den empfindlichen Protoplasten vor äußeren Noxen, fängt die osmotische Druckdifferenz zwischen innen und außen ab und gibt der Zelle die charakteristische äußere Form (61). Bei grampositiven Bakterien kann das Mureinnetz bis zu 40 Schichten dick sein und stellt hier die äußerste Schicht der Zellwand dar. Im Gegensatz dazu ist das Peptidoglykan bei gramnegativen Bakterien nur ein- bis zweischichtig ausgebildet und als weiteres komplex aufgebautes Element der Zellwand kommt bei ihnen die äußere Membran hinzu.

## 1.4 Die äußere Membran

### 1.4.1 Struktur und chemische Zusammensetzung der äußeren Membran

Die OM enthält wie die CM Lipide und Proteine und als zusätzliches Strukturelement Lipopolysaccharid (LPS). Die Doppelschicht wird nicht wie bei der CM von Lipiden gebildet, sondern von Lipiden und LPS. Die Lipide sind fast ausschließlich auf die innere Lamelle der OM beschränkt (167), wobei fast das gesamte LPS in der äußeren Lamelle der Doppelschicht lokalisiert ist (44, 106, 109). In der äußeren Membran ist das Verhältnis von Lipiden zur Membranmasse beträchtlich kleiner als in der CM. Rottem et al. (149) bestimmten für die OM ein Phospholipid/Membranmasse-Verhältnis von  $1/5,6$ , für die CM von  $1/2,6$ . Proteine machen etwa 50% der OM-Masse aus. Ein Schema der Struktur der OM ist in Abb. 2 dargestellt.

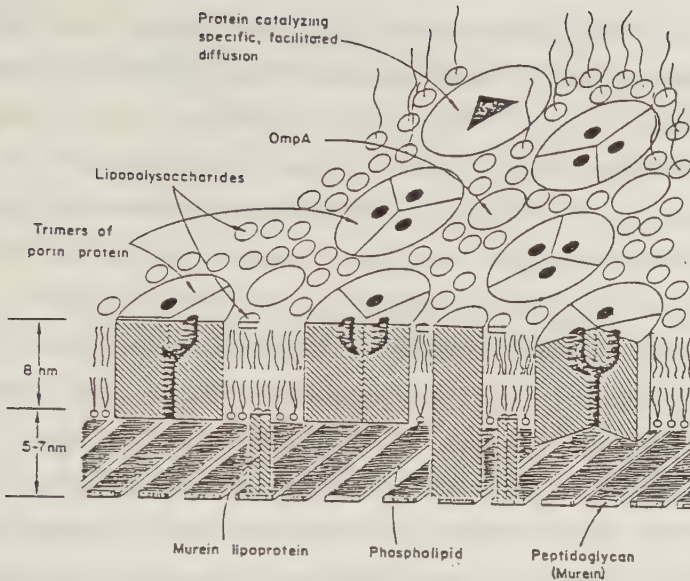


Abb. 2: Strukturelle Organisation der OM gramnegativer Bakterien. Aus (176).

#### 1.4.2 Aufbau und Funktion der wichtigsten Bausteine der äußeren Membran

##### 1.4.2.1 Die Proteine

Im Gegensatz zu früheren Befunden nach denen die OM nur wenige Proteinspezies enthalten sollte, weiß man heute durch Anwendung empfindlicherer Nachweismethoden, daß die OM reich an verschiedenen Proteinen ist. Dennoch dominieren einige wenige Proteine im Proteinmuster der OM, die so-

nannten Haupt-OM-Proteine. Zu diesen gehören die Porine, die wassergefüllte Membrankanäle bilden, durch die gelöste Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 700 Dalton diffundieren können (113). Porine sind inzwischen bei 32 Spezies aus 10 verschiedenen Familien gramnegativer Bakterien gefunden worden (54) und darüber hinaus in der OM von Mitochondrien und Chloroplasten nachgewiesen worden (14). In monomerer Form besitzen Porine ein Molekulargewicht zwischen 28000 und 48000 Dalton, kommen jedoch in der Membran als Oligomere, in der Regel als Trimere vor (112). Die wichtigsten Porine werden bei Escherichia coli K-12 durch die Gene *omp F*, *omp C* und *pho E* kodiert. Darüber hinaus kommen jedoch bei anderen Bakterien manchmal noch weitere Porine vor, wie z.B. das Omp D-Porin bei *Salmonella typhimurium* LT 2 (120) oder Protein 2 (134) und Protein K (171) bei Escherichia coli. Die drei bei Escherichia coli gut untersuchten Porine Omp F, Omp C und Pho E weisen starke Homologien ihrer Aminosäuresequenzen auf (104). In funktions-tüchtiger oligomerer Form können Porine jedoch recht unterschiedlich aufgebaut sein. In Abb. 3 ist ein Modell der dreidimensionalen Struktur von drei verschiedenen Porinen dargestellt. Danach besitzt Omp F auf der Außenseite drei Öffnungen, die nach innen in einen gemeinsamen Kanal auslaufen. Das phosphatspezifische Protein P von P. aeruginosa schließlich ist ein Trimer, bei dem das Lumen vermutlich zwecks Selektivitätserhöhung fast trichterförmig in der Mitte verengt ist.

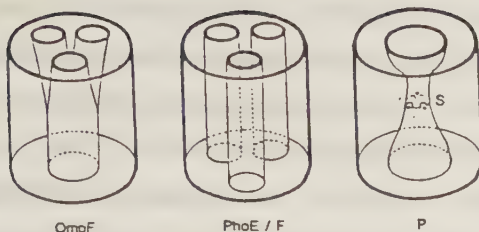


Abb. 3: Modell der dreidimensionalen Struktur von drei verschiedenen Porinen. Aus (54)

Zu den Haupt-OM-Proteinen gehört außerdem das Omp A mit einem Monomermolekulargewicht von ungefähr 35000 Dalton und das Lipoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 7200 Dalton. Omp A ist, wie die Porine, reich an  $\beta$ -Faltblattstruktur (114). Es durchspannt vermutlich die gesamte OM und reicht bis nahe ans Peptidoglykan heran, da es sowohl in intakten Zellen mit nicht penetrierenden Reagenzien markiert (70) und darüber hinaus mit der Peptidoglykanschicht quervernetzt werden kann (38). Seine Funktion ist noch nicht aufgeklärt. Eine kovalente Verbindung zwischen OM und Peptidoglykan erfolgt durch das von Braun und Rehn (18) strukturell aufgeklärte Lipoprotein, das jedoch nicht nur in der Peptidoglykan-gebundenen Form, sondern zu 2/3 auch als freies Molekül vorkommt. Die zur Verankerung in der OM notwendige Lipophilie erlangt das Lipoprotein sowohl durch die kovalente Bindung eines Fettsäurerestes am N-terminalen Cystein, als auch durch das ebenfalls über dieses Cystein

als Thioether gebundene Diglycerid (17). Der Glycerylrest ist zu 45% mit Palmitinsäure, 11% Palmitoleinsäure, 24% Stearinsäure, 12% Cyclopropylenhexadecansäure und 8% Cyclopropylenoctadecansäure substituiert. Der N-Terminus ist demgegenüber zu 65% mit Palmitinsäure, 11% Palmitoleinsäure und 11% cis-Ölsäure besetzt (17). Beim gebundenen Lipoprotein erfolgt die Verknüpfung mit dem Murein über eine Amidbindung zwischen dem C-terminalen Lysinrest und der  $\alpha$ -Carboxylgruppe eines Mesodiaminopimelinsäurerestes des Peptidoglykans (17). Obgleich das Matrix-Lipoprotein mit  $7 \times 10^5$  Kopien pro Zelle den quantitativ bedeutendsten Anteil der OM-Proteine bildet, ist es für das Überleben der Zelle nicht essentiell. Ein Fehlen des Lipoproteins macht die Zelle jedoch empfindlicher gegen Detergenzien, sowie EDTA und Gallensäuren (62). Inzwischen sind weitere, quantitativ jedoch unbedeutendere Lipoproteine mit einer ähnlichen Lipidstruktur am N-terminalen Ende entdeckt worden (66).

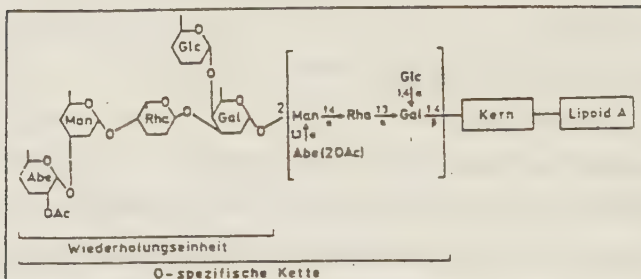
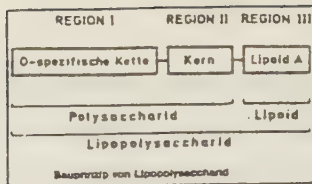
Neben den Hauptproteinen gibt es in der OM Proteine, die spezifischen Diffusionsprozessen dienen. Hierzu gehört das LamB Protein bei Escherichia coli mit Spezifität für Maltose und Maltodextrine (58, 172), das Tsx Protein mit Spezifität für Nukleoside (56), das Fep A Protein zur Aufnahme von  $\text{Fe}^{3+}$ -Enterocholin (64), das Btu B Protein zur Aufnahme

von Vitamin B12 (65) und weitere, insbesondere auch an der Eisenaufnahme beteiligte Proteine (115).

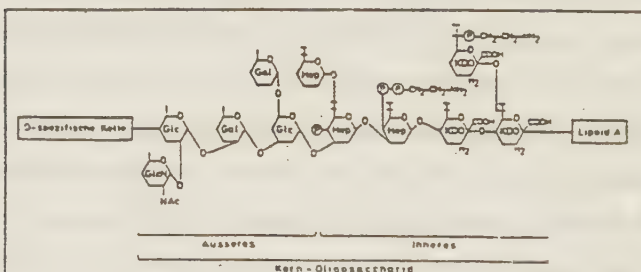
#### 1.4.2.2 Das Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharidmoleküle lassen sich in zwei Hauptregionen unterteilen, in das Lipid A, das die lipophilen Fettsäurereste enthält und in einen hydrophilen Polysaccharidanteil. Diese Polysaccharidregion besteht aus zwei Teilen mit biosynthetisch unterschiedlicher Herkunft. Die an das Lipid A gebundene Kernregion enthält als LPS-spezifische Zucker 2-Keto-3-deoxy-Octonsäure (KDO) und L-Glycerolmannoheptose und darüber hinaus Hexosen und Aminosucker. Die daran anschließende O-spezifische Seitenkette besteht aus repetitiven Einheiten verschiedener Zucker, die die serologische Spezifität des jeweiligen Lipopolysaccharides bestimmen (Abb. 4) (48). Die Längen der O-Seitenketten sind innerhalb einer Bakterienpopulation sehr unterschiedlich, d.h. man kann von einer Population sowohl LPS-Moleküle ohne Kohlenhydratseitenketten ("rauhes LPS") als auch Moleküle mit unterschiedlicher Anzahl der sich wiederholenden Kohlenhydratsequenzen isolieren.

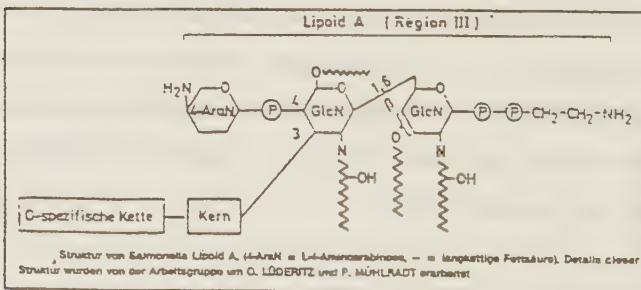
Das Grundgerüst des Lipid A kommt im LPS fast aller gramnegativer Bakterien vor. Seine chemische Struktur wurde zunächst an Salmonellen untersucht. Es besteht aus einem D-



Struktur der O-spezifischen Kette (Region I) von *Salmonella typhimurium* (O-Faktoren 4, 5, 12). (Abe = Abecrose, Man = D-Mannose, Rha = L-Rhamnose, Glc = D-Glucose, Gal = D-Galactose). Details dieser Struktur wurden in den Arbeitsgruppen von B. LINDBERG, O. LÖDERITZ, H. MIKAIJO, M. J. CSBORN, A. M. STAUB und O. WESTPHAL erarbeitet.



Struktur des *Salmonella* Kern-Oligosaccharids (Region II). (GlcNAc = N-Acetyl-D-Glucosamin, Hep = L-Glycero-D-Mannopiose, KDO = 2-Keto-3-deoxy-Octonate, P = Phosphat). Details dieser Struktur wurden im Laboratorium von O. LÖDERITZ und O. WESTPHAL sowie von B. LINDBERG erarbeitet.



Struktur von *Salmonella* Lipid A. (L-AraN = L-Araucosaminose, — = langkettige Fettsäure). Details dieser Struktur wurden von der Arbeitsgruppe um O. LÖDERITZ und P. MÜHLRADT erarbeitet.

Abb. 4: Struktur von Lipopolysaccharid. Aus (144)

Glucosamin-Disaccharid bei dem die Glucosaminreste  $\beta$ -1,6 verknüpft sind. Das Disaccharid ist in den Positionen 4' und 1 mit Phosphatgruppen verbunden, die wiederum mit Aminoarabinose oder Phosphorylethanolamin besetzt sein können. Das auf diese Weise substituierte D-Glucosamin-Disaccharid ist an seinen Hydroxyl- und Aminofunktionen mit langkettigen Fettsäuren acyliert, wodurch der lipoidale Charakter des Lipid A bedingt ist.

#### 1.4.2.3 Die Lipide

Die Phospholipidzusammensetzung der OM ist derjenigen der CM sehr ähnlich mit dem Unterschied, daß die OM einen größeren Anteil Phosphatidylethanolamin enthält (127).

#### 1.4.3 Funktionen und Eigenschaften der äußeren Membran

Die physikochemischen Eigenschaften der OM-Bestandteile, ihre quantitative Verteilung und räumliche Anordnung verleihen der OM die für sie typischen Funktionen und Eigenschaften, in denen sie sich von der CM unterscheidet. Im Gegensatz zur CM, in der, wie in anderen biologischen Membranen, die Moleküle sich relativ frei lateral bewegen können, scheint die laterale Beweglichkeit der Moleküle der OM sehr viel stärker eingeschränkt zu sein. Untersuchungen zur

Fluidität von CM und OM bei P. vulgaris (149) haben gezeigt, daß die OM eine erheblich höhere Viskosität aufweist. Welche strukturellen Eigentümlichkeiten der OM für diese Eigenschaften verantwortlich sind, kann nicht eindeutig gesagt werden.

Die OM schützt gramnegative Bakterien vor Faktoren der Wirtsabwehr, die für grampositive Bakterien toxisch sind, wie z.B. Lysozym,  $\beta$ -Lysin oder verschiedene Leukozytenproteine (36, 133, 141). Sie ermöglicht es den Bakterien auch in Gegenwart der ähnlich den Detergenzien wirksamen Gallensalze zu leben und fungiert als Permeabilitätsbarriere z.B. gegen viele Antibiotika (117). So wird eine erhöhte Resistenz insbesondere gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika oft durch das Zusammenwirken einer gegenüber diesen Antibiotika verminderten Permeabilität der OM und einer Inaktivierung der Antibiotika durch periplasmatisch lokalisierte  $\beta$ -Laktamasen bewirkt (142). Die OM macht die Oberfläche gramnegativer Bakterien hydrophil, was bei der Auseinandersetzung mit Phagozyten und dem Komplementsystem vorteilhaft ist (95). Das LPS der OM erschwert aufgrund der chemischen Heterogenität seiner O-Seitenkette eine spezifische Immunabwehr (95). Es besitzt darüber hinaus toxische Eigenschaften. So bewirkt seine Injektion in Versuchstieren unspezifische Reaktionen wie Fieber, Blutdruckabfall und Schocksymptome, die man auch als Folge einer Infektion durch gramnegative Bakterien beobachtet (48). Auch die für die OM beschriebene

Unempfindlichkeit gegen eine Desaggregation durch oberflächenaktive Substanzen ist in erster Linie dem LPS zuzuschreiben. So konnte gezeigt werden, daß Micellen von isoliertem LPS durch Einwirkung verschiedener Detergenzien nicht etwa in einzelne Moleküle dispergiert werden, sondern daß aus Gemischen von LPS mit verschiedenen ionischen und nichtionischen Detergenzien vesikuläre Membranstrukturen aufgebaut werden (118). Schließlich bildet die OM um den Protoplasten ein zusätzliches Kompartiment mit spezifischen Funktionen und Eigenschaften.

## **1.5 Der periplasmatische Raum**

Der periplasmatische Raum zwischen der OM und der CM enthält eine Vielzahl von Enzymen und löslichen Bindeproteinen, die an Transportprozessen und der Chemotaxis beteiligt sind (2, 123, 128). Er macht etwa 20 - 40% des Zellvolumens aus (170).

## **1.6 Chemie und Biosynthese der Membranbausteine**

### **1.6.1 Die Proteine**

Wie gelangen Membranproteine und die im periplasmatischen Raum lokalisierten Proteine, die ja im Cytoplasma syntheti-

siert werden, zu ihrem eigentlichen Bestimmungsort? Die Translokation von Proteinen in den periplasmatische Raum verläuft nach den bisherigen Befunden analog zur Proteinsekretion bei höheren Organismen, insbesondere zum Transfer von sekretorischen Proteinen durch die Membran in das Lumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums. Für den Export der Proteine werden dabei im wesentlichen zwei Modelle diskutiert.

#### 1. Die Signalhypothese (15, 101):

Sie basiert auf Untersuchungen an eukaryontischen Systemen. Danach wird bei der Translokation zunächst eine sogenannte Signal- oder "leader"-Sequenz am N-terminalen Ende des entstehenden Proteins synthetisiert. Unmittelbar nachdem dieses geschehen ist, bindet die Signalsequenz ein frei im Cytoplasma vorkommendes Protein (99, 184, 185). Dadurch wird die weitere Elongation inhibiert (185), bis der Signalsequenz-Protein-Komplex mit einem membranassoziierten sogenannten "docking"-Protein interagiert und so die weitere Proteinsynthese freigibt (100). Dann wird die wachsende Polypeptidkette durch einen aus Proteinen bestehenden Kanal kontinuierlich nach außen geführt. Schließlich kommt es durch eine auf der Lumenseite der Membran lokalisierte sogenannte "leader"-Peptidase zu einer proteolytischen Abtrennung der Signalsequenz.

## 2. Die Protein-Faltungshypothese ("membrane-triggered folding hypothesis"):

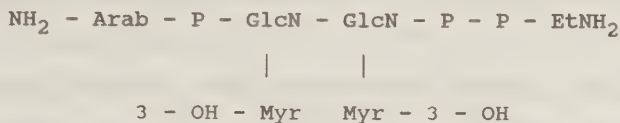
Dieses Modell wurde ursprünglich von Wickner (191, 192) für die Insertion eines Hüllproteins des Phagen M13 in die CM von Escherichia coli vorgeschlagen. In diesem Falle dient die "leader"-Sequenz dazu, dem Peptid-"precursor" eine Konformation zu vermitteln, die ihn in Lösung hält. Interagiert dieser "precursor" mit der Membran, so führt dies zu einer Konformationsänderung, durch die das Protein durch die Membran transportiert wird. Die Frage, ob bei Prokaryonten und Eukaryonten dieselben Mechanismen für den Export von Proteinen ablaufen, kann zur Zeit noch nicht eindeutig beantwortet werden. Dies gilt insbesondere für die OM-Proteine. Zu den bezüglich der Biosynthese am besten untersuchten OM-Proteinen gehört das Lipoprotein. Für dieses und andere OM- und Periplasmaproteine wurde gezeigt, daß sie aus Vorläufermolekülen mit einem zusätzlichen Peptidstück am N-Terminus, der Signalsequenz, synthetisiert werden (35, 53, 67). Obgleich von mehreren Autoren (35, 52) eine enge Verbindung der Translokation von Lipoprotein durch die CM und dem "Processing" beschrieben wurde, konnte bei einer E. coli-Mutante mit einer Aminosäureveränderung in der Signalsequenz das Prolipoprotein sowohl in der CM als auch in der OM nachgewiesen werden (90). Dies bedeutet, daß die proteolytische Spaltung zumindest bei einem Teil

des Lipoproteins für die Translokation in die OM nicht essentiell ist.

#### 1.6.2 Das Lipopolysaccharid

Die Biosynthese verläuft für die drei Teile des Lipopolysaccharidmoleküls, die Lipid A- und innere Kernregion, den äußeren Kern und die O-Seitenkette, sehr unterschiedlich. Dabei ist insbesondere über die Synthese des Lipid A und der inneren Kernregion bis jetzt wenig bekannt. Verschiedene Autoren (59, 82, 110, 143) fanden mit Hilfe unterschiedlicher Experimentalansätze sowohl für Escherichia coli als auch für Salmonella typhimurium Hinweise darauf, daß KDO über CMP-KDO in ein Intermediärprodukt der Lipid A-Biosynthese eingebaut wird. Insbesondere von Lehman et al. (83) konnte für Salmonella typhimurium gezeigt werden, daß es sich bei diesem Intermediat um ein phosphyliertes Glucosaminidiasaccharid handelt, dessen 2 Phosphatgruppen mit 4-Aminoarabinose bzw. Ethanolaminphosphat verbunden sind, und

das darüber hinaus an den beiden Aminogruppen mit 3-Hydroxymyristinsäure substituiert ist:



(Arab = Arabinose, P = Phosphat, GlcN = Glucosamin, EtNH<sub>2</sub> = Ethanolamin)

Zu der weiteren Substitution des Lipid-A-Intermediates mit anderen Fettsäuren kommt es erst, nachdem dieses zunächst mit drei Molekülen KDO verbunden worden ist. Schließlich wird an einem KDO-Rest vermutlich schrittweise über eine Nukleotidverbindung Heptose addiert (83). Bei der Untersuchung der Biosynthese der äußeren Kernregion erwiesen sich Mutanten mit Defekten in der Synthese von Nukleotidzuckern als besonders nützlich. So konnte Nikaido (116) zeigen, daß Mutanten von Escherichia coli, Salmonella typhimurium und S. enteritidis, die einen Defekt in der UDP-Galaktose-4-Epimerase aufwiesen, nur zur Synthese eines inkompletten Lipopolysaccharides befähigt waren, dessen Lipid A bis auf Glucose, Heptose und KDO keine weiteren Zucker gebunden hatte. Auch andere Autoren (43, 129, 145) haben gefunden,

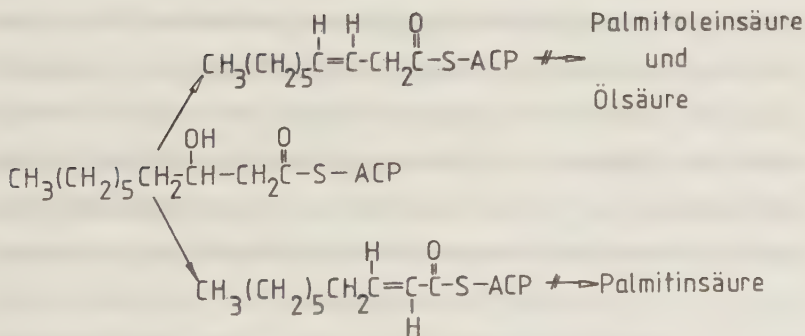
Nukleosiddiphosphat-Vorstufen eingebaut werden. Darüber hinaus konnte von Osborn et al. (129) für Salmonella typhimurium gezeigt werden, daß nur inkomplettes LPS als Akzeptor für Glykosylreste dienen kann und daß bereits die LPS-Vorstufe determiniert welcher Glykosylrest eingebaut wird.

Ähnlich der Synthese des äußeren Kerns, jedoch unabhängig davon, erfolgt die Synthese der O-spezifischen Seitenketten. Auch hier dienen Nukleosiddiphosphatderivate der Zucker als energiereiche Donatoren der Glykosylreste, jedoch werden diese nicht direkt auf das entstehende LPS-Molekül übertragen, sondern zunächst auf einen anderen Lipidcarrier, das sogenannte ACL (antigen carrier lipid) (31, 124, 125, 187, 188), bei dem es sich um Undecaprenolphosphat handelt (150, 194), das auch an der Peptidoglykansynthese als Carrier beteiligt ist. Die Polymerisation der lipidgebundenen Oligosaccharide zu den repetitiven Einheiten, die später die O-Seitenkette des LPS-Moleküls bilden, erfolgt mit Hilfe von Polymerasen (19, 146).

Der letzte Schritt der LPS-Synthese ist der Zusammenbau der vollkommen unabhängig synthetisierten Bausteine, des Lipid A mit der daran gebundenen Kernregion und der O-spezifischen Seitenkette, unter der Katalyse von O-Antigen-LPS-Ligase (30, 76).

### 1.6.3 Die Phospholipide

Die Phospholipide von Escherichia coli entstehen im wesentlichen aus folgenden Intermediärprodukten: Fettsäuren, Glycerin-3-Phosphat und L-Serin. Die Fettsäuresynthese wird bei Escherichia coli von einem im Cytoplasma lokalisierten System löslicher Enzyme katalysiert, das, im Gegensatz zur Situation bei Eukaryonten, nicht zu einem Multienzymkomplex zusammengelagert ist (16, 182). Auf eine Darstellung der allgemeinen Reaktionen der Fettsäuresynthese soll hier, mit dem Hinweis auf entsprechende Lehrbücher der Biochemie, verzichtet werden. Die Einführung der Doppelbindung erfolgt bei Escherichia coli auf dem C10-Stadium durch eine spezifische  $\beta$ -Gamma-Hydroxydecanoyl-Acyl-Carrier-Protein-Dehydrase (16, 28).



An dieser Stelle im Reaktionsablauf entscheidet sich, ob eine einfach ungesättigte oder eine gesättigte Fettsäure entsteht. Die Cyclopropanderivate der Fettsäuren von Escherichia coli entstehen unter der Katalyse eines membrangebundenen Enzyms, wobei S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator dient. Obgleich Fettsäuren während der Synthese als Thioesterderivate des Acyl-Carrier-Proteins (ACP) vorliegen, kann eine Aktivierung von exogen zugeführten Fettsäuren zur Lipidsynthese sowohl durch Bildung des entsprechenden Co-Enzym-A- als auch des ACP-Derivates erfolgen (130, 138, 139).

Glycerin-3-Phosphat entsteht in der Regel durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat, wobei die benötigten Reduktionsäquivalente durch NADPH und NADH bereitgestellt werden. Mutanten, bei denen das zu dieser Reaktion benötigte Enzym Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase nicht in funktionstüchtiger Form vorliegt, sind Glycerin- bzw. Glycerin-3-Phosphat-auxotroph (12, 29). Sie sind bei der Glycerin-3-Phosphat-Bildung auf den zweiten möglichen Syntheseweg angewiesen und zwar auf die Phosphorylierung von Glycerin durch ATP unter der Katalyse von Glycerinkinase. Die Effizienz dieses Glycerin-3-Phosphat-Syntheseweges hängt von den Wachstumsbedingungen ab. Er ist z.B. von untergeordneter Bedeutung, wenn Bakterien mit Glucose als Kohlenstoffquelle wachsen,

da Glycerinkinase durch Fructose-1,6-Bisphosphat inhibiert wird (89, 196, 197).

Die Reaktionen zur Synthese der wichtigsten Phospholipide von Escherichia coli sind in Abb. 5 dargestellt. Als erster Schritt wird Glycerin-3-Phosphat am C1 mit einer gesättigten Fettsäure acyliert (122, 140, 179), danach mit einer ungesättigten Fettsäure am C2 (122). Die so gebildete Phosphatidsäure wird anschließend in das Liponukleotid CDP-Diglycerid umgewandelt (137, 175), das wiederum als Phosphatidylgruppendonator sowohl für L-Serin als auch für Glycerin-3-Phosphat dienen kann (21, 72). Die dabei entstehenden Produkte Phosphatidylserin bzw. Phosphatidylphosphat werden dann weiter umgesetzt zu Phosphatidylethanolamin durch Decarboxylierung von Phosphatidylserin (37, 72) bzw. zu Phosphatidylglycerin durch Dephosphorylierung von Phosphatidylglycerinphosphat (22). Aus einem Teil des Phosphatidylglycerins entsteht darüber hinaus durch Reaktion mit einem zweiten Phosphatidylglycerinmolekül unter Freisetzung von Glycerin Cardiolipin (63). Während Phosphatidylethanolamin als relativ stabiles Endprodukt der Phospholipid-Biosynthese betrachtet werden kann (71, 121, 158), metabolisieren Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase Phosphatidylglycerin und Cardiolipin weiter (121, 158). Von zentraler Bedeutung sind dabei bestimmte wasserlösliche Oligosaccharide, die sogenannten MDO (membrane derived oligosaccharides), die zuerst von Kanfer und Kennedy (71) be-



schrieben wurden. MDO machen ungefähr 1% des Trockengewichtes von Escherichia coli aus. Sie sind im periplasmatischen Raum lokalisiert und bestehen aus 8 - 10 Glucoseeinheiten pro Molekül, die mit Glycerin-1-Phosphat, Succinat und Phosphorylethanolamin kovalent verbunden sind (75, 159, 181). In "pulse-chase"-Experimenten konnte durch van Golde et al. (181) gezeigt werden, daß die Glycerinphosphatgruppen der MDO aus den Polyglycerolphosphatiden (Phosphatidylglycerin, Cardiolipin) stammte. In Mutanten, die keine MDO besitzen, ist der Umsatz der Polyglycerolphosphatide deshalb sehr niedrig (158).

#### 1.7            **Topologie der Biosynthese der Bausteine der äußeren Membran**

Wie gelangen Proteine, LPS und Phospholipide der äußeren Membran zu ihrem Zielort? Diese Frage nach der Topologie der Synthese von OM-Komponenten kann zur Zeit noch nicht eindeutig beantwortet werden. Bei den Proteinen ist die Antwort insofern eingegrenzt, als ihre Synthese an Ribosomen gebunden ist, deren Vorhandensein im periplasmatischen Raum ausgeschlossen werden kann. Ihre Synthese muß daher im Cytoplasma der Zellen erfolgen. Völlig unklar ist demgegenüber die Topologie der LPS- und Phospholipidsynthese. Die wichtigsten Intermediärprodukte bei der Synthese von Phospholipiden und LPS    (Glycerin-3-Phosphat, L-Serin,

Fettsäuren, CTP und Nukleotidzucker) werden unter der Katalyse löslicher Enzyme im Cytoplasma gebildet. Die an der weiteren Biosynthese von LPS und Phospholipiden beteiligten Enzyme sind, mit Ausnahme von Phosphatidylserin-Synthetase, die zum größten Teil mit Ribosomen assoziiert ist (69, 73, 136), membrangebunden (13, 102, 103, 126, 127, 157, 180, 190). In Frage kommende Syntheseorte für Phospholipide und LPS sind deshalb möglicherweise gegen den Rest der Membranen abgegrenzte Domänen der CM, OM bzw. der Kontaktstellen zwischen der CM und OM, wie sie von Bayer (6) in Dünnschnitten von plasmolysierten *E. coli*-Zellen beobachtet wurden. Das Problem der Zuordnung des Syntheseortes von OM-Komponenten ist bisher über zwei verschiedene Ansätze angegangen worden, erstens durch Untersuchungen an isolierten Membranfragmenten und zweitens durch Untersuchungen an intakten Zellen. Der erste Ansatz ist notwendigerweise eng verknüpft mit dem Problem der Auftrennung und Identifizierung möglichst im nativen Zustand erhaltener Membranfraktionen. Die zu diesem Zweck allgemein angewendete Technik basiert auf einer ursprünglich von Miura und Mizushima (102) veröffentlichten und von Osborn et al. (127) weiterentwickelten Methode. Diese beruht auf der Herstellung von Sphäroplasten in Gegenwart von Lysozym und EDTA, die anschließend lysiert wurden. Aus den Zelltrümmern erhält man durch Ultrazentrifugation ein Membrangemisch, das durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation in OM und CM aufgetrennt werden kann. "Pulse-chase"-Markierungen von Bakte-

rien mit radioaktiven Vorläufermolekülen von Lipiden und LPS (13, 126, 190) und Analysen zur Enzymverteilung (102, 103, 126, 127, 157) führten zu dem Ergebnis, daß die Synthese von OM-Lipiden und LPS in Membranfraktionen erfolgt, die sich in ihrer Schwimmdichte von der CM nicht unterschieden. Diese Membranfragmente wurden deshalb mit der CM gleichgesetzt.

Mehrere Autoren (5, 8, 9, 79, 106, 108, 129, 151, 152, 168) haben Experimente zur Insertion von neusynthetisiertem LPS aber auch von Proteinen in die OM durchgeführt. So arbeiteten Mühlradt et al. (106, 108) mit Mutanten von Salmonella typhimurium und Escherichia coli, denen eine funktionstüchtige UDP-Galaktose-4-Epimerase fehlte. Als Folge der Mutation benötigen diese Bakterien ein Galaktose-enthaltendes Medium, um vollständige LPS-Moleküle synthetisieren zu können. Mühlradt et al. (107) konnten anhand elektronenoptischer Analysen unter Verwendung ferritinmarkierter Antikörper mit Spezifität für vollständige LPS-Moleküle zeigen, daß auf der OM-Oberfläche der Bakterien ungefähr 30 Sekunden nach Zugabe von Galaktose an etwa 220 abgegrenzten Stellen neusynthetisiertes LPS erschien. Darüber hinaus wurde an plasmolysierten Bakterien beobachtet, daß die ferritinmarkierten Flächen zum größten Teil über Kontaktstellen der OM und CM lokalisiert waren.

Die Verteilung des Rezeptors für den Phagen Lambda wurde von Ryter et al. (151, 152) untersucht, mit dem Ergebnis, daß dieser Rezeptor in einer bestimmten Phase des Teilungszyklus und dann in der Region des entstehenden Septums in der OM erschien. Auch Begg und Donachie (8, 9) kamen nach Experimenten zur Insertion des Rezeptors für den Phagen T6 zu dem Schluß, daß dieser präferentiell an den Polen in die OM eingeführt wird. Gegen eine Verallgemeinerung der beschriebenen Befunde für andere OM-Proteine sprechen die von Smit und Nikaido (168) veröffentlichten Ergebnisse, nach denen ein Porin von Salmonella typhimurium über Kontaktstellen zwischen der CM und der OM in die OM eingebaut wird und diese sind statistisch über die gesamte Oberfläche verteilt.

## 1.8 Problemstellung

Die Topologie der Synthese der Haupt-OM-Bestandteile (Proteine, LPS, Phospholipide) ist zur Zeit noch weitgehend ungeklärt. Die bisher zur Topologie von LPS und OM-Lipiden publizierten Befunde gehen auf Untersuchungen von Osborn et al. (126, 127, 128) zurück bzw. wurden unter Benutzung der von Osborn publizierten Methode der Membranisolierung ermittelt. Danach erfolgt die Synthese beider OM-Bestandteile in Membranfraktionen, die sich in ihrer Schwimmdichte von der CM nicht unterscheiden. Diese Membranfragmente wurden mit der CM gleichgesetzt.

Das Problem der Lokalisierung von Syntheseorten für OM-Lipide, OM-Proteine und LPS bei gramnegativen Bakterien ist notwendigerweise eng verknüpft mit dem Problem der Isolierung, Auftrennung und Identifizierung der in Frage kommenden Strukturen der Zellhülle. Angestrebt wird eine Methode, bei der die Membranbruchstücke in ihrer Zusammensetzung und darüber hinaus in der strukturellen Anordnung ihrer Elemente dem nativen Zustand entsprechen.

Osborn et al. (127) präparierten zunächst Sphäroplasten in Gegenwart von EDTA und Lysozym, die dann durch osmotischen Schock oder Ultraschallbehandlung zerstört wurden. Das Membrangemisch wurde anschließend sedimentiert und durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Dabei

erscheint die Verwendung von EDTA als problematisch, denn von mehreren Autoren wurden membranverändernde Effekte dieses Chelators beschrieben (51, 84, 85, 117). Ein weiterer kritischer Aspekt, dem bisher keine Beachtung geschenkt wurde, ergibt sich aus der Tatsache, daß eine vollständige Trennung der Gesamtmembranen in OM und CM nicht möglich ist, da einerseits beide Strukturen in Subfraktionen unterschiedlicher Schwimmdichte zerfallen und da es andererseits bereits in der Zellhülle vermutlich Kontaktstellen zwischen der CM und OM gibt, wie sie zuerst von Bayer (6) beschrieben wurden. Diese bleiben möglicherweise auch nach der Zerstörung der Zellen als solche erhalten und ihre Schwimmdichte liegt wahrscheinlich intermediär zwischen derjenigen der CM und der OM (7, 68). Bei der Zuordnung eines Synthesortes von OM-Bestandteilen erscheint es deshalb besonders notwendig, die Frage nach einer eventuellen Vermischung von Membranmaterial topologisch unterschiedlicher Herkunft, jedoch gleicher oder sehr ähnlicher Schwimmdichte abzuklären.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, daß die in dieser Untersuchung angewendeten Methoden eine Isolierung und Trennung von Membranen unter Verzicht auf die Zugabe von EDTA ermöglichen. Um eine Solubilisierung und Umlagerung von Membrankomponenten zu verhindern, wurde auch bewußt auf die Zerstörung von Bakterien durch Ultraschallbehandlung verzichtet. Die beiden in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden der Membranisolierung er-

schienen darüber hinaus als besonders geeignet, da sie nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation zu einer guten Trennung der Hauptfraktionen von OM und CM führten und Membranprofile erbrachten, die sowohl untereinander als auch mit den von Osborn et al. (127) veröffentlichten vergleichbar waren.

Die bei den beiden Methoden der Zellzerstörung festgestellte Übereinstimmung in der Dichtegradientenverteilung der Hauptmembranfraktionen in Verbindung mit gravierenden Unterschieden in der Verteilung von quantitativ unbedeutenden Membransubfraktionen und insbesondere von radioaktiven Membranfraktionen nach "pulse-chase"- und kontinuierlicher Markierung der Bakterien mit  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  als Vorstufe von Phospholipiden bildeten eine gute Voraussetzung für die Untersuchung der Topologie der OM-Lipid-Synthese. Diese steht im Mittelpunkt des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit.

## 2. **Material und Methoden**

### 2.1 **Material**

#### 2.1.1 **Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien waren sämtlich von höchstem Reinheitsgrad (p.A.) und wurden, falls nicht anders erwähnt von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

#### 2.1.2 **Radioaktive Verbindungen**

Folgende radioaktive Verbindungen wurden verwendet:

[2-<sup>3</sup>H]Glycerin, 1 Ci/mmol (Amersham, England);

[2-<sup>3</sup>H]Glycerin, 11,5 Ci/mmol (New England Nuclear, USA);

[U-<sup>14</sup>C]Glycerin, 171 mCi/mmol (Amersham, England);

L-[U-<sup>14</sup>C]Aminosäuren, 10 mCi/mmol (Amersham, England).

#### 2.1.3 **Antibiotika**

Für die Versuche wurden die Antibiotika Aztreonam (Squibb-Hedyn, München), Ciprofloxacin (Bayer, Leverkusen), Imipenem (Merck, Sharp and Dohme, USA) und Latamoxef (Eli

Lilly, USA) verwendet. Die Reinsubstanzen wurden von den Firmen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

#### **2.1.4 Puffer**

##### **2.1.4.1 HEPES-Saccharose-Lysozym-Puffer**

Der zur Plasmolyse der Bakterien verwendete HEPES-Saccharose-Lysozym-Puffer setzte sich zusammen aus: 0,75 M Saccharose, 50 µg/ml Lysozym und 0,05 M N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethan-Sulfonsäure (HEPES). Der pH-Wert wurde mit 2 N NaOH auf 7,2 eingestellt.

##### **2.1.4.2 Probenpuffer für die Gelelektrophorese**

Der Probenpuffer setzte sich zusammen aus: 20 ml Glycerin, 5 ml 2-Mercaptoethanol, 25 ml 0,25 M Tris/HCl (pH 6,8), 2 g Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 mg Bromphenolblau und 50 ml Aqua dest..

##### **2.1.4.3 Elektrodenpuffer für die Gelelektrophorese**

Der Elektrodenpuffer bestand aus einer wäßrigen Lösung von 20 g/l Glycin, 3 g/l Tris und 1 g/l SDS.

## 2.1.5 Lösungen

### 2.1.5.1 Lösung für die Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Färbelösung bestand aus 0,7 g Coomassie Brilliant Blue R250 (LKB, Bromma, Schweden), 110 ml Methanol, 110 ml Aqua bidest. und 23 ml Essigsäure.

### 2.1.5.2 Entfärbelösung für Polyacrylamidgele

Als Entfärbelösung wurde ein Methanol-Essigsäure-Wasser-Gemisch (9:3:38 (v/v)) verwendet.

## 2.1.6 Nährmedien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in folgenden Nährmedien:

a) Mueller-Hinton-Bouillon (Merck, Darmstadt), b) Do-Minimalmedium (50): 7 g  $K_2HPO_4$ , 2 g  $KH_2PO_4$ , 0,5 g Natriumcitrat, 1 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,1 g  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 3% Glycerin in 1 l.

### 2.1.7 Bakterien

Es wurden folgende E. coli-Stämme verwendet: WF96 (St. Mary's Hospital, London; O7:K1:H6), D509 (Dundee University; O86:H4), die von Patienten mit Harnwegsinfekten isoliert wurden und die beiden E. coli K-12-Stämme JE5505 lpo<sup>+</sup> und JE5506 lpo<sup>-</sup> (62), die aus dem Labor von Y. Hirota (National Institut of Genetics, Mishima, Japan) stammen. Darüber hinaus wurde Pseudomonas aeruginosa, Stamm PA01 (55), der aus dem Labor von R.E.W. Hancock (University of British Columbia, Vancouver, Kanada) stammt, verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Analytische Methoden

#### 2.2.1.1 Bestimmung von Protein, KDO und Phospholipidphosphat

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Markwell et al. (97), KDO wurde nach der von Karkhanis et al. (74) angegebenen Methode, Phospholipidphosphat nach der von Lowry et al. (91) angegebenen Methode bestimmt.

#### 2.2.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proben für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (60  $\mu\text{g}$  Protein) wurden lyophilisiert, in 50  $\mu\text{l}$  Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten gekocht.

Die Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Lugtenberg et al. (93) durchgeführt. Das Trenngel enthielt 11% Polyacrylamid. Die Trennung erfolgte über einen Zeitraum von 4,5 h bei einer konstanten Stromstärke von 27 mA pro Gel.

Für den Nachweis von Proteinen wurden die Gele 30 Minuten mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und in der unter 2.1.5.2 beschriebenen Lösung für 48 h entfärbt.

#### 2.2.1.3 Enzymbestimmungen

##### 2.2.1.3.1 Messung der NADH-Oxidase-Aktivität

Die NADH-Oxidase-Aktivität wurde nach der Methode von Wallach und Kamat (183) bestimmt.

#### **2.2.1.3.2 Messung der D-Lactat-, Glucose- und Succinat-Dehydrogenase-Aktivität**

Die D-Lactat-, Glucose- und Succinat-Dehydrogenase-Aktivität wurde nach der Methode von Osborn et al. (127) bestimmt.

#### **2.2.1.3.3 Messung der 5'-Nucleotidase-Aktivität**

Die 5'-Nucleotidase-Aktivität wurde nach der Methode von Nossal und Heppel (119) bestimmt.

#### **2.2.1.4 Fettsäureanalyse**

##### **2.2.1.4.1 Vorbereitung des Probenmaterials**

Die Bestimmung der Gesamtfettsäuren wurde nach einer Methode von Gmeiner und Martin (49) durchgeführt. Für jede Probe wurden 100 nmol Phosphat aus dem Phospholipidextrakt eingesetzt. Den getrockneten Proben wurden 10  $\mu$ l einer 0,01 M methylierten Pentadecan-Fettsäure-Lösung als interner Standard zugegeben und mit 250  $\mu$ l 5%igem NaOH in 50% Methanol versetzt. Der Ansatz wurde 15 Minuten auf 100 °C erhitzt, mit 80  $\mu$ l 6 N HCl angesäuert und nach Zusatz von 200  $\mu$ l  $\text{BF}_3$ /Methanol 5 Minuten auf 100 °C erhitzt. Die Methylester der durch alkalische Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren wurden nach Zugabe von 300  $\mu$ l Wasser mit Petrol-

ether extrahiert. Die eingetrockneten Proben wurden in 50  $\mu$ l Chloroform aufgenommen und 5  $\mu$ l davon gaschromatographisch analysiert.

#### **2.2.1.4.2 Bedingungen und Auswertungen der gaschromatographischen Analyse**

Die Fettsäureanalysen wurden mit einem Gaschromatographen der Firma Varian Modell 3700, der mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstet war, durchgeführt. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine "Fused Silica"-Kapillarsäule des Typs FS-FFAP-CB-0,25 (Macherey-Nagel, Düren). Zur Auftrennung wurde mit einem Temperaturprogramm gearbeitet. Die Injektortemperatur betrug 220 °C, die Anfangstemperatur 140 °C und die Endtemperatur, die nach 60 Minuten erreicht wurde, betrug 200 °C. Die Detektortemperatur war auf 250 °C eingestellt. Als Trägergas diente Stickstoff (30 ml/min.).

Die einzelnen Fettsäuremethylester wurden durch Vergleich mit den Retentionszeiten von Standardsubstanzen identifiziert. Die Mengen der methylierten Fettsäuren wurden aus der Fläche der Peaks im Vergleich zu bekannten Mengen des internen Standards ermittelt.

#### **2.2.1.5 Elektronenoptische Untersuchungen**

Die Membransuspensionen wurden auf Formvar-beschichtete Kupfernetze (200 mesh, Balzers, Wiesbaden) aufgebracht. Nach 15 Minuten wurde das überschüssige Material abgesaugt und die Präparate wurden 2 Minuten mit 2% (w/v) Uranylacetat in Aqua dest. kontrastiert. Anschließend wurden die Proben einmal mit Aqua dest. gewaschen und luftgetrocknet. Die Untersuchungen wurden mit einem Philips Elektronenmikroskop durchgeführt.

#### **2.2.1.6 Bestimmung der MHK**

Die Bestimmung der MHK wurde nach DIN 58940 im Mikrotiterplattenverfahren durchgeführt.

### **2.2.2 Präparative Methoden**

#### **2.2.2.1 Extraktion von LPS und Phospholipiden**

LPS wurde nach der Phenol/Wasser-Methode extrahiert und durch fraktionierte Cetavlonfällung weiter gereinigt. (Verfahren 3 nach Westphal und Jann (189)). Phospholipide wurden nach der Methode von Folch et al. (40) mit Chloroform-Methanol extrahiert.

## 2.2.2.2 Zerstörung der Bakterien

Zur Zerstörung der Bakterien wurden folgende Methoden angewendet:

### 1. Osmotische Lyse (OL):

Diese Methode wurde von Kroll et al. (78) beschrieben. Bakterien aus 100 - 600 ml Kultur wurden, falls nicht besonders vermerkt, bei einer  $OD_{580}$  von etwa 0,5 durch Zentrifugation (15 Minuten, 4 °C, 8000 g) sedimentiert, in 5 ml HEPES-Saccharose-Lysozym-Puffer suspendiert, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und eingefroren. Bei "pulse-chase"-Experimenten wurden die Zellen vor der Zentrifugation in einem Trockeneis-Ethanol-Bad schnell auf 4 °C abgekühlt, um das Wachstum zu stoppen. Nach dem Auftauen wurden die Bakterien durch Überführung in 120 ml Aqua bidest., das 1 mg DNase I (Sigma) enthielt, lysiert. Die Vollständigkeit der Lyse wurde mikroskopisch kontrolliert.

### 2. Hochfrequentes Schütteln der Bakterien in Gegenwart kleiner Glasperlen - "mickle desintegration" (MD) (154):

Bakterien aus 100 - 2000 ml Kultur wurden durch Zentrifugation (15 Minuten, 4 °C, 8000 g) sedimentiert, in 17 ml HEPES-Saccharose-Lysozym-Puffer, der 100 µg DNase I (Sigma)/ml enthielt, suspendiert, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und eingefroren. Danach wurden die Bakterien in einer Zelmühle (Bühler, Tübingen) durch Schütteln

(15 Minuten) in Gegenwart von Glasperlen (Durchmesser: 0,17 mm) unter Kühlung zerstört und die Lyseflüssigkeit wurde von den Glasperlen unter mehrmaligem Waschen mit Aqua bidest. abfiltriert (100 - 160  $\mu$ m Porengröße).

### 3. Ultraschallbehandlung (US):

Bakterien aus 200 ml Kultur wurden in 5 ml HEPES-Saccharose-Lysozym-Puffer suspendiert, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und eingefroren. Nach dem Auftauen wurden jeweils 2,5 ml der Suspension 3 mal 20 Sekunden mit einem Branson sonifier bei Leistungsstufe 7 (Mikrotip) beschallt. Die Lyseflüssigkeit wurde mit Aqua bidest., das 50  $\mu$ g DNase/ml enthielt, auf 120 ml aufgefüllt.

#### 2.2.2.3 Isolierung und Auftrennung von Membrangemischen

Die Membranbruchstücke wurden durch Ultrazentrifugation (1 h, 130000 g, 4 °C) der nach der Zerstörung der Bakterien erhaltenen Lyseflüssigkeit vom löslichen Material abgetrennt. Anschließend wurde das sedimentierte Membrangemisch in 1 ml 0,05 M HEPES-Puffer (pH 7,2) suspendiert und durch Ultrazentrifugation (16 h, 120000 g, 4 °C) in einem linearen Saccharosedichtegradienten (25 - 65% (w/w) Saccharose in 0,05 M HEPES-Puffer (pH 7,2)) aufgetrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient durch eine bis zum Boden des Röhrchens vorgeschobene Glaskapillare von unten her mit einer Peristaltikpumpe (Flußrate: 50 ml/h) abgesaugt und

mit Hilfe eines Fraktionskollektors fraktioniert (Fraktionsvolumen: 1 ml). Während des Absaugens wurde die Extinktion bei 278 nm mit einem Uvicord-Photometer (LKB Rockville, USA) kontinuierlich registriert. Die Saccharosekonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch bestimmt. Zur weiteren Analyse wurden die Peakfraktionen vereinigt und mindestens 2 mal in 0,05 M HEPES-Puffer (pH 7,2) gewaschen.

### 2.2.3 "Pulse-chase"-Markierung von Bakterien mit [2-<sup>3</sup>H]Glycerin

Die Bakterien wurden, sofern nicht anders erwähnt, bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>580</sub> ungefähr 0,5) bei 37 °C unter Schütteln in Mueller-Hinton-Bouillon inkubiert und unter kräftigem Schütteln mit 0,4 µCi [2-<sup>3</sup>H]Glycerin/ml versetzt. 10 Sekunden später wurde das radioaktive Material 1:10<sup>5</sup> mit kaltem Glycerin verdünnt, um den weiteren Einbau von [2-<sup>3</sup>H]Glycerin zu verhindern. Zu unterschiedlichen Zeiten nach Zugabe des radioaktiven Glycerins wurden der Kultur Proben entnommen, im Trockeneis-Ethanol-Bad auf 4 °C gekühlt und zentrifugiert. Die Bakterien wurden dann unter Anwendung unterschiedlicher Methoden zerstört, ihre Membranen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufge-

trennt, und die in den einzelnen Fraktionen des Gradienten enthaltene Radioaktivität gemessen.

#### 2.2.4 Analyse des $^3\text{H}$ -markierten Materials

Bakterien des E. coli-Stammes D509 wurden wie folgt mit  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  markiert:

##### 1. Kontinuierliche Markierung:

Zu 200 ml Mueller-Hinton-Bouillon wurden  $0,4 \mu\text{Ci}$   $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  ( $1 \text{ Ci/mMol}$ ) und  $20 \mu\text{l}$  Übernachtskultur pro ml pipettiert. Der Ansatz wurde anschließend unter Schütteln bei  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{580}$  von  $0,5$  inkubiert. Die Kultur wurde dann in einem Trockeneis-Ethanol-Bad abgekühlt.

##### 2. "Pulse"-Markierung:

$400 \text{ ml}$  Mueller-Hinton-Bouillon wurden mit  $80 \mu\text{l}$  Übernachtskultur pro ml beimpft. Der Ansatz wurde anschließend unter Schütteln bei  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{580}$  von  $0,5$  inkubiert und dann mit  $0,4 \mu\text{Ci}$   $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin/ml}$  für  $10$  Sekunden "pulse"-markiert.  $200 \text{ ml}$  der Kultur wurden unmittelbar danach in einem Trockeneis-Ethanol-Bad auf  $4^\circ\text{C}$  gekühlt und zentrifugiert, der Rest der Kultur wurde für weitere  $30$  Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert und dann gekühlt und zentrifugiert.

Nach der Markierung wurden die Bakterien durch Anwendung der OL-Methode zerstört. Anschließend wurden Proben der Lysate und der Überstände nach Ultrazentrifugation der Lysate einer Chloroform-Methanol-Extraktion (2.2.2.1) unterzogen. Die jeweils in der Chloroform- und Methanolphase enthaltene Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (1216 Rackbeta; LKB, Bromma, Schweden) gemessen.

### 3. **Ergebnisse**

#### 3.1 **Untersuchung der Effizienz der Zellzerstörung durch osmotischen Schock**

Es wurde zunächst an E. coli WF96 überprüft, ob eine Zellzerstörung von Bakterien durch osmotischen Schock auch dann möglich ist, wenn auf den Zusatz des Chelators EDTA, der die Stabilität und Integrität der OM etwa durch die Herauslösung von zweiwertigen Kationen und damit die Freisetzung von LPS herabsetzt, verzichtet wird.

Dazu wurde das Wachstum einer Schüttelkultur in Mueller-Hinton-Bouillon photometrisch bestimmt. Bei optischen Dichten (580 nm) von 0,5 (180 Minuten), 0,8 (225 Minuten) und 2,4 (24 h) wurden jeweils zwei gleich große Volumina der Kultur entnommen. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation sedimentiert, in 0,9% NaCl gewaschen, in HEPES/Saccharose/Lysozym-Puffer suspendiert, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und eingefroren. Damit standen von Bakterien, die unterschiedlich lange gewachsen waren, jeweils 2 identische Proben zur Verfügung. Die Zellen jeweils einer der Proben wurden dann nach der OL-Methode, die der anderen durch Ultraschallbehandlung zerstört. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Proteingehalte der Lyseflüssigkeit, des Überstandes der Lyseflüssigkeit nach Ultrazentrifugation und des entsprechenden Sedi-

menten. Darüber hinaus wurde das periplasmatisch lokalisierte Enzym 5'-Nucleotidase im Überstand quantifiziert (Tab. 1).

Es zeigte sich, daß die angewendeten Methoden der Zellzerstörung bei Bakterien, die bis zu einer optischen Dichte von 0,5 und 0,8 gewachsen waren, in Bezug auf die Proteinanteile von Überstand und Sediment sehr ähnliche Ergebnisse erbrachten. Dennoch war bei der Probe der länger gewachsenen Bakterien nach Anwendung der OL-Methode der Anteil an sedimentierbarem Protein im Vergleich zur US-Methode signifikant erhöht. Die hier bereits angedeutete Tendenz wurde bei Bakterien der Übernachtskultur mit einem Anteil von 50% (OL-Methode) gegenüber 25,1% (US-Methode) an sedimentierbarem Protein besonders deutlich.

Nach Anwendung der OL-Methode konnte bei Bakterien, die bis zu einer optischen Dichte von 0,5 und 0,8 gewachsen waren, etwa 70% der 5'-Nucleotidaseaktivität im Vergleich zur US-Methode im Überstand der zentrifugierten Lyseflüssigkeit nachgewiesen werden. Bei Bakterien die über Nacht gewachsen waren lag dieser Wert bei 85%, wobei die spezifische Aktivität des Enzyms in diesem Fall sogar höher lag als bei den ultraschallbehandelten Bakterien.

Die Zerstörung von Bakterien und anderen Zellen durch Ultraschall ist allgemein als effizient anerkannt und eignet

Tab. 1: Vergleichende Analyse (US, OL) zur Effizienz der Zellzerstörung von Bakterien des E. coli-Stammes WF96

| Probe                    | NG<br>(g) | Lysat<br>(mg) | Gesamtprotein<br>Überstand<br>(mg) | Sediment<br>(mg) | % <sup>1</sup> | spez. Akt. Gesamtakt.<br>(U/g) (U) | 5'Nucleoditase<br>im Überstand<br>% <sup>2</sup> |
|--------------------------|-----------|---------------|------------------------------------|------------------|----------------|------------------------------------|--------------------------------------------------|
| US                       |           |               |                                    |                  |                |                                    |                                                  |
| OD <sub>580</sub> =0,525 | 0,556     | 29            | 26                                 | 4,7              | 16,2           | 88,8                               | 2,3                                              |
| OL                       |           |               |                                    |                  |                |                                    |                                                  |
| OD <sub>580</sub> =0,525 | 0,524     | 30            | 25                                 | 5,3              | 17,7           | 64,7                               | 1,6                                              |
| US                       |           |               |                                    |                  |                |                                    |                                                  |
| OD <sub>580</sub> =0,789 | 0,507     | 36            | 29                                 | 6,3              | 17,5           | 82,7                               | 2,4                                              |
| OL                       |           |               |                                    |                  |                |                                    |                                                  |
| OD <sub>580</sub> =0,789 | 0,608     | 35            | 27                                 | 9,1              | 26,0           | 62,7                               | 1,7                                              |
| US                       |           |               |                                    |                  |                |                                    |                                                  |
| OD <sub>580</sub> =2,420 | 1,323     | 57            | 42                                 | 14,3             | 25,1           | 56,8                               | 2,4                                              |
| OL                       |           |               |                                    |                  |                |                                    |                                                  |
| OD <sub>580</sub> =2,420 | 1,282     | 119           | 33                                 | 59,5             | 50,0           | 61,7                               | 2,0                                              |

NG = Naßgewicht der Bakterien von jeweils 200 ml Bakteriensuspension  
US, (OL) = Probe nach Beschallung, (osmotischer Lyse) der Zellen  
spez. Akt. = spezifische Aktivität  
Gesamtakt. = Gesamtzymbaktivität  
%<sup>1</sup> = sedimentierbarer Anteil des im Lysat enthaltenen Proteins  
%<sup>2</sup> = Anteil der durch osmotische Lyse freigesetzten 5'Nucleotidase von der durch Beschallung freigesetzten 5'Nucleotidase  
Arithmetische Mittelwerte von 2 Versuchen

sich deshalb als Standard für andere Methoden. Aus den beschriebenen Befunden kann somit gefolgert werden, daß die in dieser Untersuchung häufig angewendete Methode der Zellzerstörung durch osmotischen Schock bei Escherichia coli, die bis zur spätlogarithmischen Phase gewachsen sind, auch ohne Zusatz von EDTA sehr wirksam ist. Die effiziente Freisetzung des periplasmatisch lokalisierten Enzyms 5'Nucleotidase zeigt, daß die OL-Methode darüber hinaus auch bei spätstationären Zellen zu einer starken Beeinträchtigung der Integrität und vermutlich auch zu einer zumindest partiellen Freisetzung der OM führt. Auf eine Ablösung von Zellhüllstrukturen (Periplasma, OM), die jedoch nicht oder nur zum Teil von einer Lyse der Zellen begleitet wird, deutet auch der bei spätstationären Zellen nach der osmotischen Schockbehandlung hohe Anteil an sedimentierbaren Protein und die relativ hohe spezifische Aktivität der 5'Nucleotidase im Überstand hin. Die Abnahme in der Effizienz der Lyse, die bei spätstationären Bakterien festgestellt wurde, könnte auf einer wachstumsphasenabhängigen Veränderung der Peptidoglykanstruktur und einer damit verbundenen Verschlechterung der Hydrolysierbarkeit durch Lysozym beruhen. Die Richtigkeit dieser Vermutung wurde durch eine Aminosäureanalyse der OM von *Escherichia coli* WF96 und D509 überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß die OM eine wachstumsphasenabhängige Erhöhung im DAP-Gehalt aufwies, wohingegen bei den übrigen Aminosäuren mit wenigen Ausnah-

men (Glu, His) keine Stamm-unabhängige Veränderung feststellbar war (Tab. 2).

### 3.2 Auftrennungen von Membrangemischen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Membrangemische, die durch Zerstörung der Bakterien und anschließende Ultrazentrifugation von ihrem cytoplasmatischen und periplasmatischen Inhalt befreit wurden, können durch isopyknische Saccharosedichtegradientenzentrifugation in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt werden. Abb. 6 zeigt zwei typische Membranprofile von *E. coli* WF96 und D 509, wobei die Bakterien in diesen Fällen durch osmotischen Schock zerstört wurden. Prinzipiell sehr ähnliche Verteilungen erhält man auch nach "mickle desintegration" der Bakterien. Es bilden sich regelmäßig drei Hauptmembranfraktionen mit Schwimmdichten von  $1,28 - 1,24 \text{ g/cm}^3$  (Peak I),  $1,17 \text{ g/cm}^3$  (Peak II) und  $1,15 \text{ g/cm}^3$  (Peak III) (Abb. 6). Im Gegensatz zu den Peaks II und III, die homogen und symmetrisch erscheinen, ist das in Peak I enthaltene Membranmaterial in sich sehr heterogen. Bei Escherichia coli kann Peak I in mindestens vier Subfraktionen mit signifikant unterschiedlichen Schwimmdichten von  $1,28 \text{ g/cm}^3$  (Peak Ia),  $1,27 \text{ g/cm}^3$  (Peak Ib),  $1,26 \text{ g/cm}^3$  (Peak Ic) und  $1,24 \text{ g/cm}^3$  (Peak Id) unterteilt werden (Tab. 3). Die quantitativen An-

Tab. 2: Aminosäurezusammensetzung der äußeren Membranen von E. coli WF96 und E. coli D509 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

|     | WF96                |                     |                     | D509                |                     |                     |
|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|     | OD <sub>580</sub> = | OD <sub>580</sub> = | OD <sub>580</sub> = | OD <sub>580</sub> = | OD <sub>580</sub> = | OD <sub>580</sub> = |
|     | 0,103               | 0,442               | 0,844               | 0,127               | 0,612               | 0,834               |
| Asp | 144,12              | 147,39              | 130,09              | 152,63              | 149,22              | 127,77              |
| Thr | 68,37               | 68,09               | 60,34               | 60,88               | 57,61               | 55,64               |
| Ser | 84,56               | 83,40               | 71,82               | 81,82               | 77,60               | 70,47               |
| Glu | 107,27              | 111,85              | 141,34              | 111,57              | 136,15              | 172,76              |
| Gly | 104,40              | 100,65              | 85,62               | 90,45               | 96,00               | 86,64               |
| Ala | 122,81              | 120,61              | 115,66              | 118,27              | 110,72              | 110,48              |
| Val | 44,35               | 44,16               | 44,19               | 39,38               | 37,50               | 39,95               |
| Dap | 3,28                | 3,39                | 4,15                | 3,34                | 3,03                | 5,11                |
| Ile | 29,06               | 28,38               | 30,16               | 26,81               | 25,02               | 27,70               |
| Leu | 74,68               | 74,88               | 80,52               | 74,42               | 68,74               | 75,89               |
| Tyr | 44,31               | 43,65               | 39,39               | 47,25               | 46,34               | 38,02               |
| Phe | 41,32               | 36,83               | 40,78               | 44,86               | 41,51               | 38,16               |
| Lys | 55,54               | 56,76               | 59,92               | 75,46               | 76,36               | 68,11               |
| His | 19,43               | 20,13               | 23,15               | 16,52               | 16,78               | 21,60               |
| Arg | 55,79               | 54,55               | 55,86               | 53,27               | 49,90               | 53,85               |

Alle Angaben in nmol Aminosäure/ $\mu$ mol Gesamt-Aminosäuren

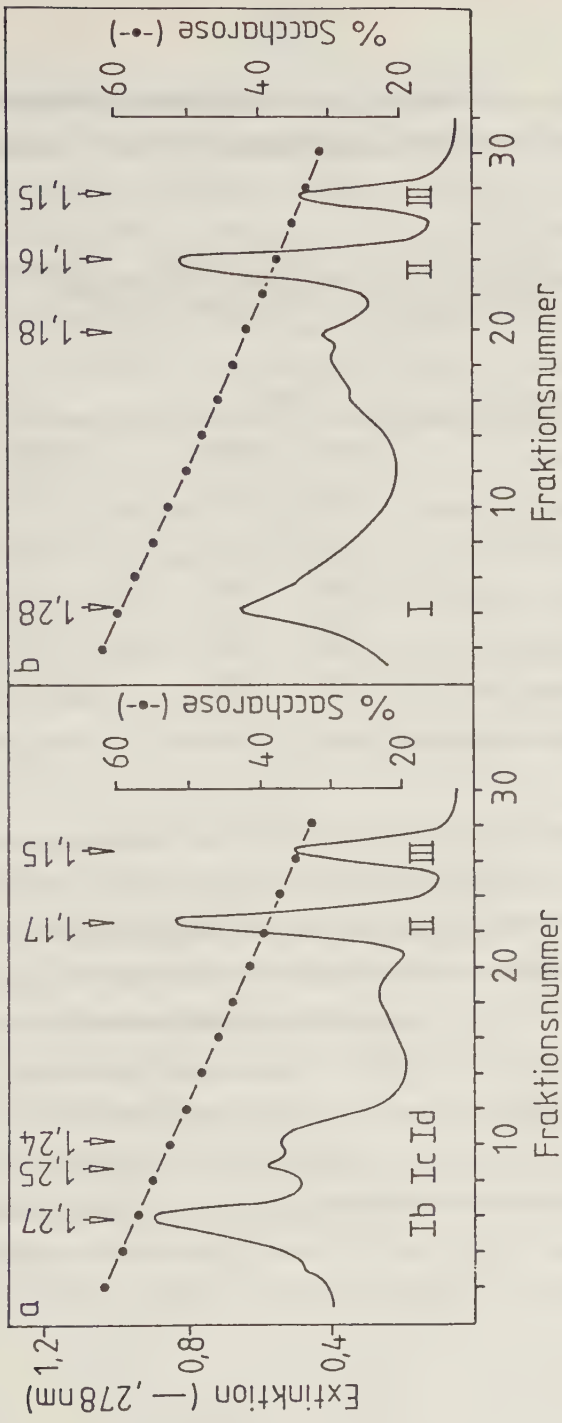


Abb. 6: Verteilung der Membranbruchstücke von *Escherichia coli* WF96 (a) und *Escherichia coli* D509 (b) nach Saccharosedichtgradientenzentrifugation.

teile der Subfraktionen am Gesamt-Peak-I-Material unterscheiden sich bei den verschiedenen E. coli- Stämmen und

Tab. 3: Schwimmdichten der durch Saccharosedichte-gradientenzentrifugation getrennten Membranfraktionen von E. coli WF96 und E. coli D509.

| Membranfraktion | WF96          | D509          |
|-----------------|---------------|---------------|
| Ia              | 1,283 ± 0,005 | 1,282 ± 0,003 |
| Ib              | 1,281 ± 0,004 | 1,269 ± 0,004 |
| Ic              | 1,255 ± 0,003 | 1,256 ± 0,003 |
| Id              | 1,244 ± 0,003 | -             |
| II              | 1,166 ± 0,011 | 1,167 ± 0,005 |
| III             | 1,145 ± 0,009 | 1,144 ± 0,006 |

Alle Angaben in g/cm<sup>3</sup>

sind darüber hinaus durch die Kulturbedingungen beeinflusbar. Bei Membranen von frühstationären Bakterien besteht Peak I hauptsächlich aus den Subfraktionen Ia und Ib, bei frühlogarithmischen dagegen hauptsächlich aus Fraktion Ic. Dieser bei der Isolierung der unterschiedlichen Peak-I-Subfraktionen beobachtete wachstumsabhängige Shift zu höheren Schwimmdichten kann durch Zugabe von subinhibitorischen Konzentrationen verschiedener  $\beta$ -Laktamatibiotika in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration unterdrückt werden (88).

Membranen anderer Spezies oder Familien können sich in der Schwimmdichte von Peak-I-Membranen gravierend von den für Escherichia coli bestimmten unterscheiden. Dieser Befund soll beispielhaft an *Pseudomonas aeruginosa* PA01 dargestellt werden. Darüber hinaus soll gezeigt werden, daß das Medium einen starken Einfluß auf die Membranverteilung ausüben kann. Der Keim wurde parallel bis zu einer optischen Dichte (580 nm) von ungefähr 0,5 in Merck-Bouillion unter Zusatz von 20 mM Succinat bzw. 0,4% Glucose inkubiert. Abb. 7 zeigt, daß nach dem Wachstum in Gegenwart von Succinat neben Peak-II- und Peak-III-Material, Membranfraktionen mit Schwimmdichten von 1,24 und 1,21 g/cm<sup>3</sup> isoliert werden können (Abb.7b), während nach Wachstum in Gegenwart von Glucose eine Membranfraktion mit einer Schwimmdichte von 1,22 g/cm<sup>3</sup> von Peak II und Peak III getrennt werden konnte (Abb. 7a).

### 3.3 Identifizierung der durch isopyknische Saccharosedichtegradientenzentrifugation voneinander getrennten Membranfraktionen

#### 3.3.1 EM-Untersuchung

Proben der Peakfraktionen I, II und III wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, daß sich die in Peak I enthaltenen Membranbruchstücke von denen der

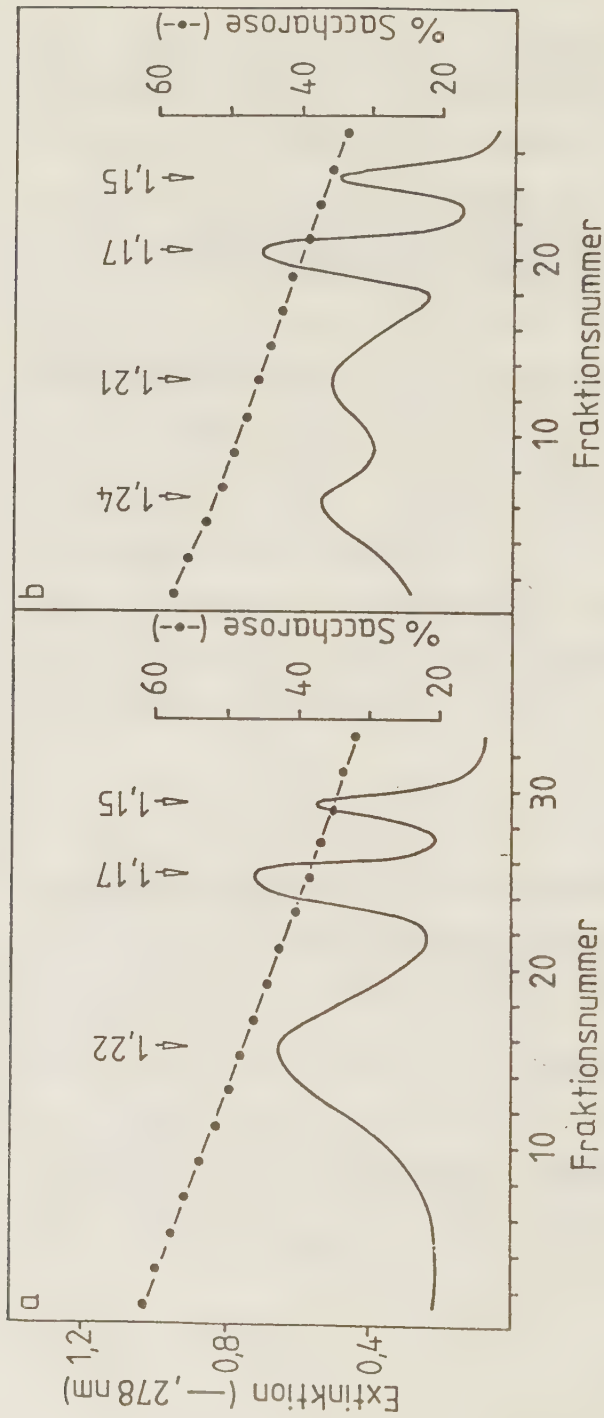


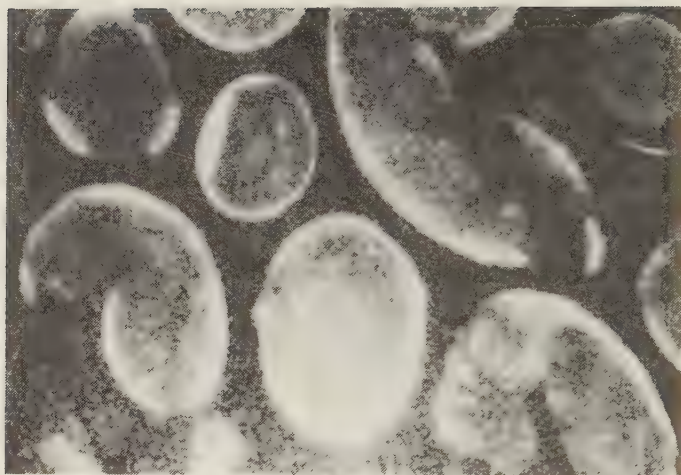
Abb. 7: Verteilung der Membranbruchstücke von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Die Keime wurden in Medium, dem Glucose (a) bzw. Succinat (b) zugesetzt wurde, angezüchtet.

Peaks II und III morphologisch sehr stark unterscheiden. Peak I enthält Membranbruchstücke mit Ausmaßen von 0,1 - 0,2  $\mu\text{m}$ , die zum Teil nicht in sich geschlossen sind und eine scharfe und starr wirkende Begrenzung aufweisen. Im Gegensatz dazu sind die in Peak II und Peak III enthaltenen Membranbruchstücke mit Durchmessern von bis zu 0,4  $\mu\text{m}$  größer und in sich geschlossen. Die Begrenzung dieser Vesikel wirkt fluider und weniger scharf begrenzt (Abb. 8).

### 3.3.2 SDS-PAGE

Die Proteinzusammensetzung des in Peak I, II und III enthaltenen Membranmaterials wurde durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 9). Dabei zeigte sich, daß in Peak-I-Material einige Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von 30 - 40 kD und beim E. coli-Stamm D 509 zusätzlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 44 kD quantitativ besonders stark hervortraten, wohingegen in Peak-II- und Peak-III-Material eine homogenere Proteinverteilung vorlag. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß die in Peak I hervortretenden Proteinbanden auch in Peak II und III gut nachgewiesen werden konnten. Die Bandenmuster der jeweils korrespondierenden Membranpeaks von Bakterien, die durch osmotischen Schock oder durch "mickle desintegration" zerstört wurden, zeigten keine auffälligen Unterschiede. Für mehrere Proteine konnte eine asymmetrische Verteilung zwischen Peak II

a



b

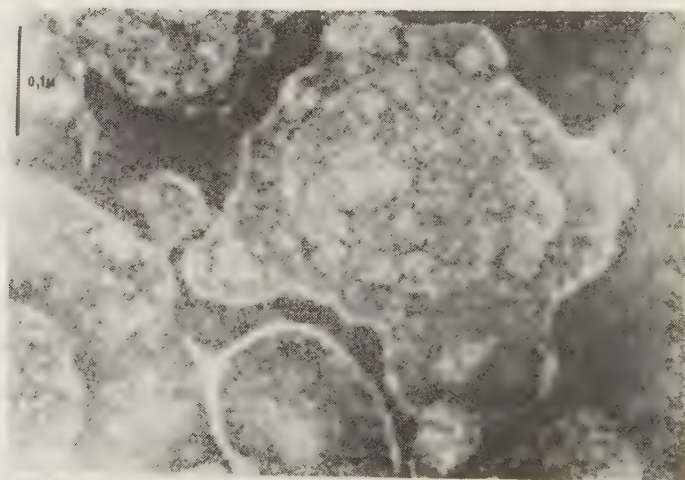


Abb. 8: Elektronenmikroskopische Analyse der in Peak I (a) und Peak II (b) enthaltenen Membranbruchstücke.

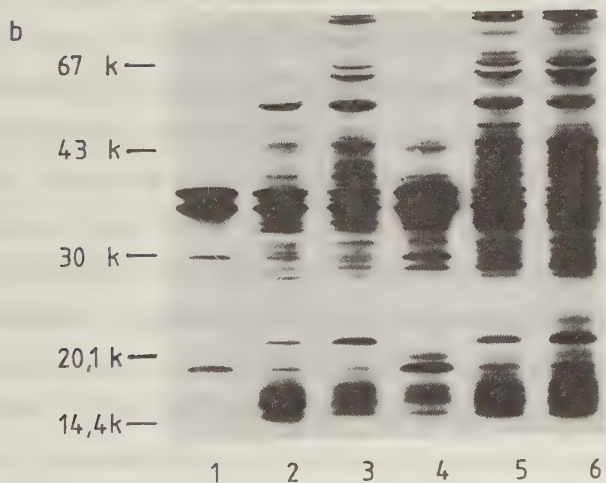
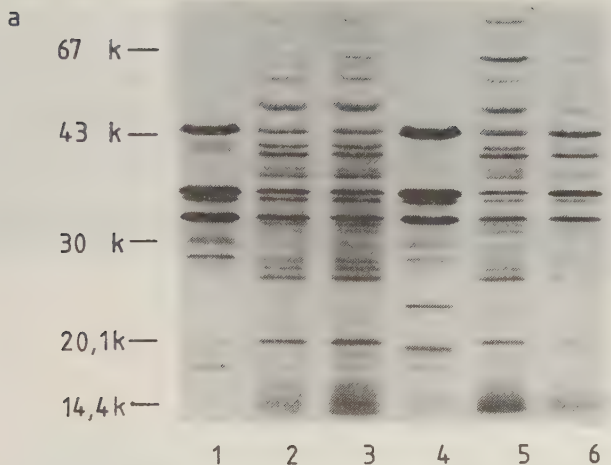


Abb. 9: SDS-PAGE-Analyse der in Peak I (1, 4), II (2, 5) und III (3, 6) enthaltenen Proteine. Die Zerstörung der Bakterien erfolgte nach der OL- (1 - 3) bzw. MD-Methode (4 - 6).  
a) *Escherichia coli* D509      b) *Escherichia coli* WF96

und III festgestellt werden. Dieser Befund wurde besonders deutlich in einer Gradientengelaufentrennung (7 - 20%) von Membranmaterial des E. coli-K12-Stammes JE5505 und der entsprechend Lipoprotein-negativen Mutante JE5506. Abb. 10a, b zeigt die Verteilung der Membranfragmente im Saccharosedichtegradienten und Abb. 10c, d zeigt die entsprechende SDS-PAGE-Analyse der in Abb. 10a, b hervorgehoben markierten Gradientenfraktionen. Die Bakterien wurden nach der MD-Methode zerstört.

### 3.3.3 **Markerenzyme der CM**

Zur weiteren Charakterisierung der Membranpeaks wurden die in ihnen enthaltenen Aktivitäten einiger typischer CM-Markerenzyme bestimmt (Tab. 4). Die höchsten spezifischen Enzymaktivitäten waren jeweils entweder in Peak-II- oder in Peak-III-Membranmaterial nachzuweisen. Im Vergleich zu der jeweils höchsten der in den 3 Membranfraktionen gemessenen spezifischen Aktivität lag die spezifische Aktivität in Peak I bei Membranen von Bakterien, die durch osmotischen Schock zerstört wurden zwischen 6 - 22% und bei denjenigen, die durch "mickle desintegration" zerstört wurden, zwischen 2,9 - 13%. Prinzipiell waren die Ergebnisse für die korrespondierenden Membranfraktionen der unterschiedlich zerstörten Bakterien tendenziell gleich. Alle gemessenen En-

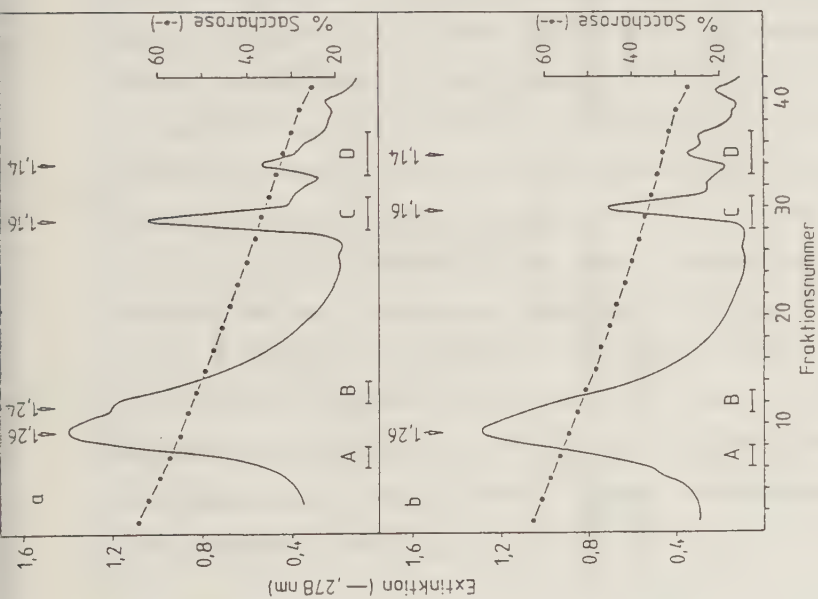
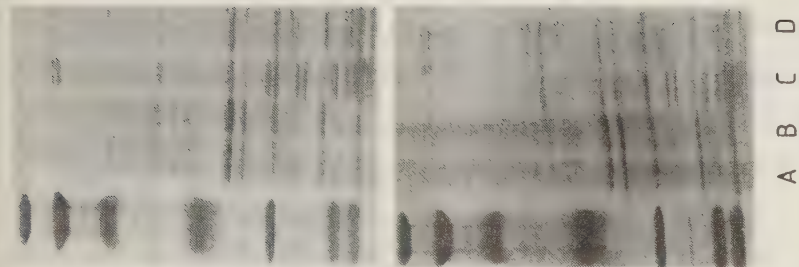


Abb. 10: Verteilung der Membranbruchstücke von *Escherichia coli* JE5505 (a) und der Lipoprotein-negativen Mutante JE5506 (b) nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation und SDS-PAGE-Analyse c), d) der in a), b) markierten Gradientenfraktionen.  
 Standardproteine: 116250 ( $\beta$ -Galactosidase), 92500 (Phosphorylase B), 66200 (Rinderserumalbumin), 45000 (Ovalbumin), 31000 (Carboanhydrase), 21500 (Trypsininhibitor), 14400 (Lysozym).



Tab. 4: Spezifische Aktivität einiger CM-Markerenzyme, in den nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation erhaltenen Membranfraktionen von *Escherichia coli* D509 nach Zerstörung der Bakterien durch Anwendung der OL- bzw. MD-Methode

Spezifische Aktivität (mU/mg Protein)

| Methode | Peak-<br>fraktion | Glucose-<br>dehydrogenase | D-Lactat-<br>dehydrogenase | NADH-<br>oxidase | Succinat-<br>dehydrogenase |
|---------|-------------------|---------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|
| OL      | I                 | 4,62 ± 1,21               | 5,35 ± 1,14                | 302,5 ± 38,5     | 28,13 ± 3,91               |
|         | II                | 21,36 ± 2,91              | 26,11 ± 2,51               | 1055,3 ± 82,0    | 130,56 ± 14,58             |
|         | III               | 75,61 ± 10,44             | 40,19 ± 9,46               | 319,5 ± 180,0    | 39,21 ± 16,58              |
| MD      | I                 | 3,05 ± 1,16               | 3,28 ± 1,41                | 98,0 ± 25,2      | 17,68 ± 3,13               |
|         | II                | 45,08 ± 15,04             | 21,85 ± 6,99               | 871,8 ± 128,2    | 139,47 ± 13,27             |
|         | III               | 104,55 ± 13,63            | 46,94 ± 7,09               | 286,8 ± 156,5    | 0,00                       |

zyme waren sehr ungleichmäßig auf die in Peak II und III enthaltenen Membranbruchstücke verteilt.

Über die Bestimmung der in den gepoolten Membranfraktionen enthaltenen Enzymaktivitäten hinaus wurde die NADH-Oxidase-Aktivität auch in den einzelnen Fraktionen eines Gradienten gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 11 dargestellt.

#### 3.3.4 Solubilisierbarkeit mit Sarkosyl

Filip et al. (39) konnten zeigen, daß eine differentielle Solubilisierung der CM aus Gesamtmembranextrakten gramnegativer Bakterien möglich ist, so daß nach Ultrazentrifugation der so behandelten Membranen in erster Linie OM-Material sedimentiert. Als weitere Eigenschaft zur Charakterisierung der Membranfraktionen wurde deshalb ihre Solubilisierbarkeit durch Sarkosyl untersucht. Dazu wurden Bakterien des E. coli-Stammes D 509 durch osmotischen Schock zerstört und die durch Zentrifugation erhaltenen Membranen in 0,05 M HEPES-Puffer, der 0%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3% und 0,4% Sarkosyl enthielt, suspendiert. Das nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (45 Minuten, 130000 g) erhaltene Membransediment wurde dann durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt.

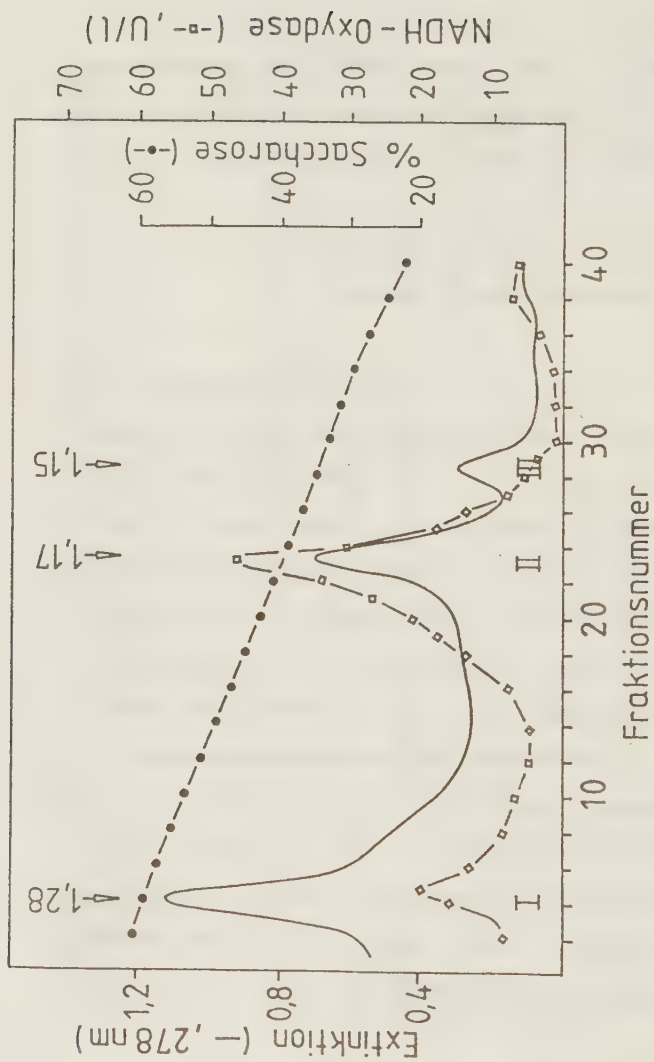
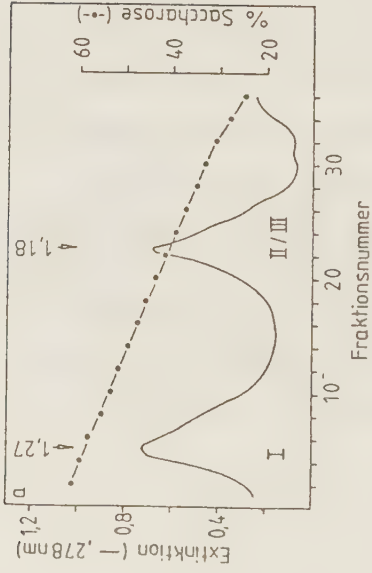
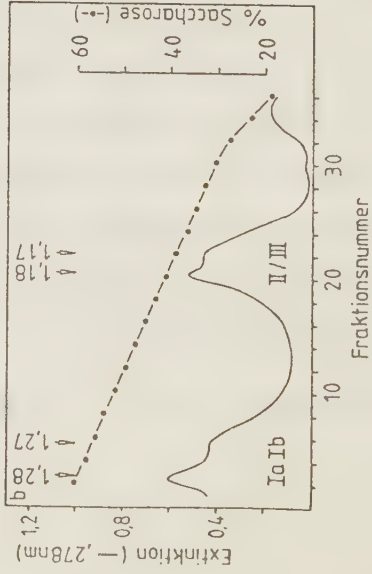
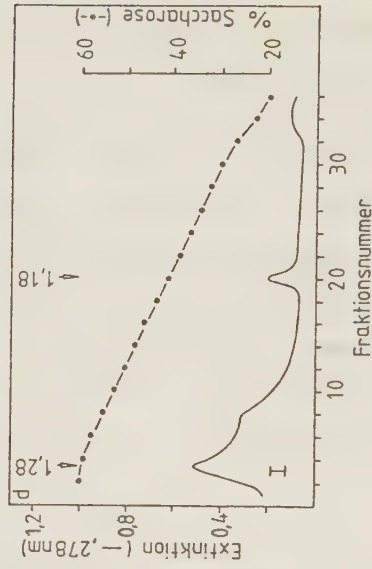
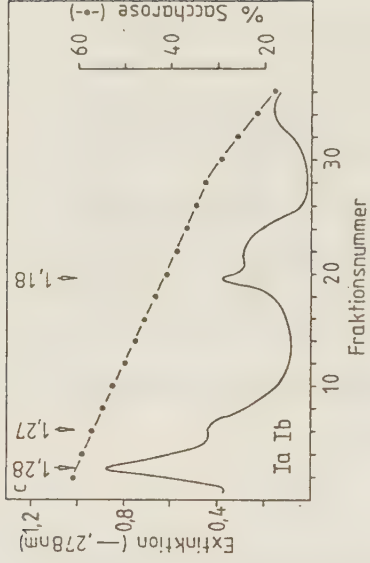


Abb. 11: Verteilung der NADH-Oxidase-Aktivität nach Auftrennung der Membranen von *Escherichia coli* D509 im Saccharosedichtegradienten.

Obgleich auch Peak-I-Material zum Teil durch Sarkosyl solubilisiert werden konnte, erwies sich dieses doch erheblich resistenter gegenüber dem Tensid als das in Peak II/III enthaltene (Abb. 12). Bereits bei einer Konzentration von 0,1% war dieses zu einem großen Teil und bei 0,3% fast vollständig solubilisiert. Durch die Detergenzbehandlung wurde darüber hinaus wiederum deutlich, daß Peak-I-Membranmaterial bezüglich der Schwimmdichte inhomogen ist. Bereits bei einer Sarkosylkonzentration von 0,05% zeigte sich, daß Peak I aus mindestens zwei Subfraktionen mit Schwimmdichten von  $1,28 \text{ g/cm}^3$  und  $1,27 \text{ g/cm}^3$  bestand.

### 3.3.5 Die quantitative Zusammensetzung der Membranfraktionen aus LPS, Phospholipiden und Protein

In Tab. 5 ist die Zusammensetzung der Membranfraktionen I, II und III aus Protein, LPS und Phospholipiden unter Berücksichtigung der Methode, nach der die Bakterien zerstört wurden (osmotische Lyse, "mickle desintegration"), dargestellt. Es sei an dieser Stelle vermerkt, daß LPS allgemein als Marker der äußeren Membran verwendet wird. Grundsätzlich waren die Ergebnisse für die korrespondierenden Membranfraktionen von Bakterien, die nach der OL- und MD-Methode zerstört worden waren, sehr ähnlich. Peak I enthielt jeweils 52 - 55% Protein, 25 - 32% LPS und 16 - 20% Phospholipide, Peak II 55 - 59% Protein, 5 - 8% LPS und 36 -



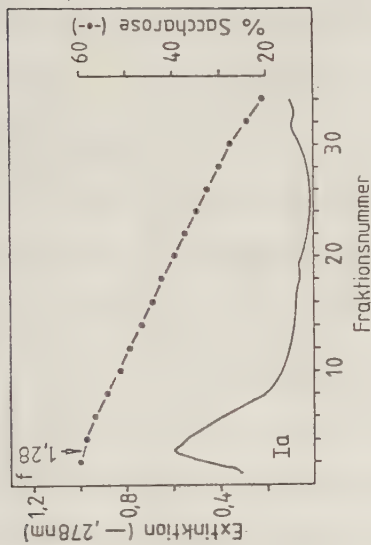
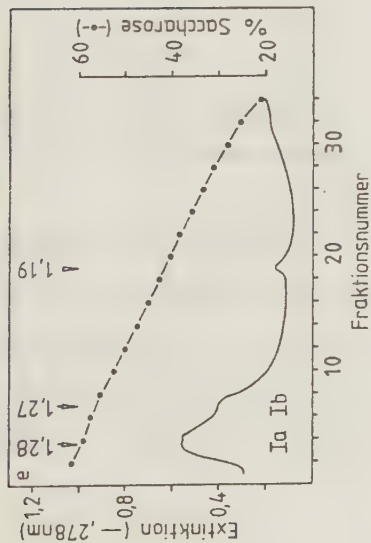


Abb. 12: Verteilung der nach Sarkosyl-Behandlung sedimentierbaren Membranbruchstücke vom *Escherichia coli* D509 nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Folgende Sarkosylkonzentrationen wurden benutzt:  
a) 0% b) 0,05% c) 0,1% d) 0,2% e) 0,3% und f) 0,4%

Tab. 5: Zusammensetzung der nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation erhaltenen Membranfraktionen von *Escherichia coli* D509 nach Zerstörung der Bakterien durch Anwendung der OL- und MD-Methode.

a) Bestimmung der KDO/- und PL-P/Protein-Quotienten

| Membran-<br>fraktion | OL                               |                          | MD                               |                          |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|
|                      | $\mu\text{g KDO/}$<br>mg Protein | nmol PL-P/<br>mg Protein | $\mu\text{g KDO/}$<br>mg Protein | nmol PL-P/<br>mg Protein |
| I                    | 18,36 $\pm$ 0,98                 | 284,95 $\pm$ 11,24       | 24,32 $\pm$ 2,58                 | 251,70 $\pm$ 26,40       |
| II                   | 5,75 $\pm$ 0,50                  | 527,70 $\pm$ 14,14       | 3,60 $\pm$ 0,32                  | 486,00 $\pm$ 27,65       |
| III                  | 9,81 $\pm$ 0,47                  | 243,85 $\pm$ 9,82        | 4,80 $\pm$ 0,63                  | 264,83 $\pm$ 24,72       |

b) Ermittlung der LPS/- und PL/Protein-Quotienten unter Zugrundelegung des für gereinigtes LPS von *Escherichia coli* D509 bestimmten KDO-Gehaltes von 3,9 % und des für gereinigte PL bestimmten Phosphatgehaltes von 800 nmol/mg.

| Membran-<br>fraktion | OL                             |                               | MD                             |                              |
|----------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
|                      | $\text{mg LPS/}$<br>mg Protein | $\text{mg PL/}$<br>mg Protein | $\text{mg LPS/}$<br>mg Protein | $\text{mg PL}$<br>mg Protein |
| I                    | 0,47 $\pm$ 0,03                | 0,36 $\pm$ 0,01               | 0,62 $\pm$ 0,07                | 0,31 $\pm$ 0,03              |
| II                   | 0,15 $\pm$ 0,01                | 0,66 $\pm$ 0,02               | 0,09 $\pm$ 0,01                | 0,61 $\pm$ 0,03              |
| III                  | 0,25 $\pm$ 0,01                | 0,30 $\pm$ 0,01               | 0,12 $\pm$ 0,02                | 0,33 $\pm$ 0,03              |

c) Ermittlung der prozentualen Zusammensetzung aus Protein, LPS und PL.

| %       | OL   |      |      | MD   |      |      |
|---------|------|------|------|------|------|------|
|         | I    | II   | III  | I    | II   | III  |
| Protein | 54,6 | 55,2 | 64,5 | 51,8 | 58,8 | 68,9 |
| LPS     | 25,7 | 8,3  | 16,1 | 32,1 | 5,3  | 8,3  |
| PL      | 19,7 | 36,5 | 19,4 | 16,1 | 35,9 | 22,8 |

KDO = 2-Keto-3-deoxy-octonat      PL = Phospholipide      PL-P = Phospholipidphosphat  
MD = Mickle Desintegration      OL = osmotische Lyse

37% Phospholipide und Peak III 64 - 69% Protein, 8 - 16% LPS und 19 - 23% Phospholipide. Die größten Unterschiede bestanden in der Zusammensetzung von Peak-I- und Peak-II-Material. Während der Proteingehalt der Membranen sehr ähnlich war, enthielt Peak-II-Material nur etwa 15 - max. 32% des in Peak-I-Material nachgewiesenen LPS. Im Gegensatz dazu besaß Peak-I-Material nur etwa 43 - 56% des Phospholipidgehaltes von Peak-II-Material. Bei Peak-III-Material war der Proteingehalt von ungefähr 66% auffällig hoch. Der LPS- und Phospholipidgehalt lag hier zwischen den für Peak-I- und Peak-II-Material bestimmten Werten. Obgleich die angewendeten Methoden der Membranisolierung zu tendenziell ähnlichen Ergebnissen führten, scheint die Trennung von Peak-I-Material und den übrigen Membranen nach Anwendung der MD-Methode im Vergleich zur OL-Methode schärfer zu sein, denn in diesem Fall wurde LPS besonders stark in Peak I angereichert.

### **3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Auftrennung von Membrangemischen**

Aufgrund der beschriebenen Befunde zur Charakterisierung der nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation voneinander getrennten drei Hauptmembranfraktionen erscheint eine Zuordnung dieser Peaks zur OM bzw. CM möglich. In Peak-I-Material wurden, unabhängig von der zur Membranisolierung

angewendeten Methode, Fragmente der äußeren Membran angereichert. Diese Zuordnung erfolgte aufgrund folgender Kriterien:

1. Die Membranfragmente besaßen die für die äußere Membran typische Morphologie.
2. Peak-I-Membranmaterial zeigte nach gelelektrophoretischer Auftrennung das für die OM typische Proteinmuster.
3. Peak-I-Material enthielt einen für die äußere Membran charakteristisch hohen Anteil an LPS.
4. Die Membranen dieser Peakfraktion besaßen den für die äußere Membran beschriebenen hohen Grad der Resistenz gegenüber der solubilisierenden Wirkung von Sarkosyl.

Die Peaks II und III enthielten eine Anreicherung von CM-Vesikeln, denn dieses Membranmaterial besaß, über die charakteristische Morphologie und Proteinverteilung in der SDS-PAGE hinaus, eine relativ hohe Empfindlichkeit gegenüber Detergenzien und enthielt den größten Teil der typischen CM-Markerenzyme.

### 3.4 Die Dichtegradientenverteilungen markierter und unmarkierter Membranbruchstücke von [2-<sup>3</sup>H]Glycerin-markierten Bakterien

Die im folgenden beschriebenen Experimente dienten zur Bestimmung des Syntheseortes von OM-Lipiden. Zur spezifischen Markierung der Lipide wurde [2-<sup>3</sup>H]Glycerin verwendet, das die Tritiummarkierung an NAD<sup>+</sup> bzw. NADP<sup>+</sup> verliert, wenn es nicht direkt acyliert, sondern über andere Stoffwechselwege metabolisiert wird. Zur Eingrenzung des Syntheseortes wurden "pulse-chase"-Experimente durchgeführt, bei denen der radioaktive Lipidbaustein zu den logarithmisch wachsenden Bakterien pipettiert wurde, um dann, nach einem möglichst kurzen Inkubationszeitraum, den weiteren Einbau von radioaktivem Glycerin durch Zugabe eines 10<sup>5</sup>-fachen Überschusses an "kaltem" Glycerin zu verhindern. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Markierung wurden dann Proben zur Isolierung und Trennung der Membranen entnommen, um den, innerhalb der Zellhülle, von den radioaktiv markierten Lipiden "eingeschlagenen" Weg zu verfolgen.

#### 3.4.1 "Pulse-chase"-Markierung der Bakterien und Zellzerstörung durch Anwendung unterschiedlicher Methoden

In diesem Versuch sollte die Dichtegradientenverteilung von radioaktiv markierten und unmarkierten Membranen, die parallel durch Anwendung der OL- und der MD-Methode isoliert wurden, verglichen werden. Dazu wurden Bakterien bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{580}$  ungefähr 0,5) in Mueller-Hinton-Medium angezüchtet und anschließend durch Zugabe von  $[2-^3H]$ Glycerin radioaktiv markiert. Nach 10 Sekunden Inkubation wurde eine weitere Aufnahme von  $[2-^3H]$ Glycerin durch die Bakterien durch die Zugabe eines Überschusses an kaltem Glycerin zum Medium verhindert. Die Bakterien wurden dann entweder unmittelbar nach der Markierung oder nach weiterer Inkubation (10 Minuten) bei  $37^{\circ}C$ , in einem Ethanol-Trockeneis-Bad auf  $4^{\circ}C$  abgekühlt. Von dem einen Teil der so markierten Bakterien wurden Membranen unter Anwendung der OL-Methode, von dem anderen unter Anwendung der MD-Methode isoliert und durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Abb. 13 zeigt die Membranprofile von E. coli D509. Dabei wurde die optische Dichte bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) und die Radioaktivität kontinuierlich bzw. in jeder Fraktion des Gradienten gemessen. Bei der Ermittlung der allgemeinen Verteilung des Membranmaterials durch die Bestimmung der  $OD_{280}$  waren keine Unterschiede zwischen Membranen von Bakterien, die nach der OL-

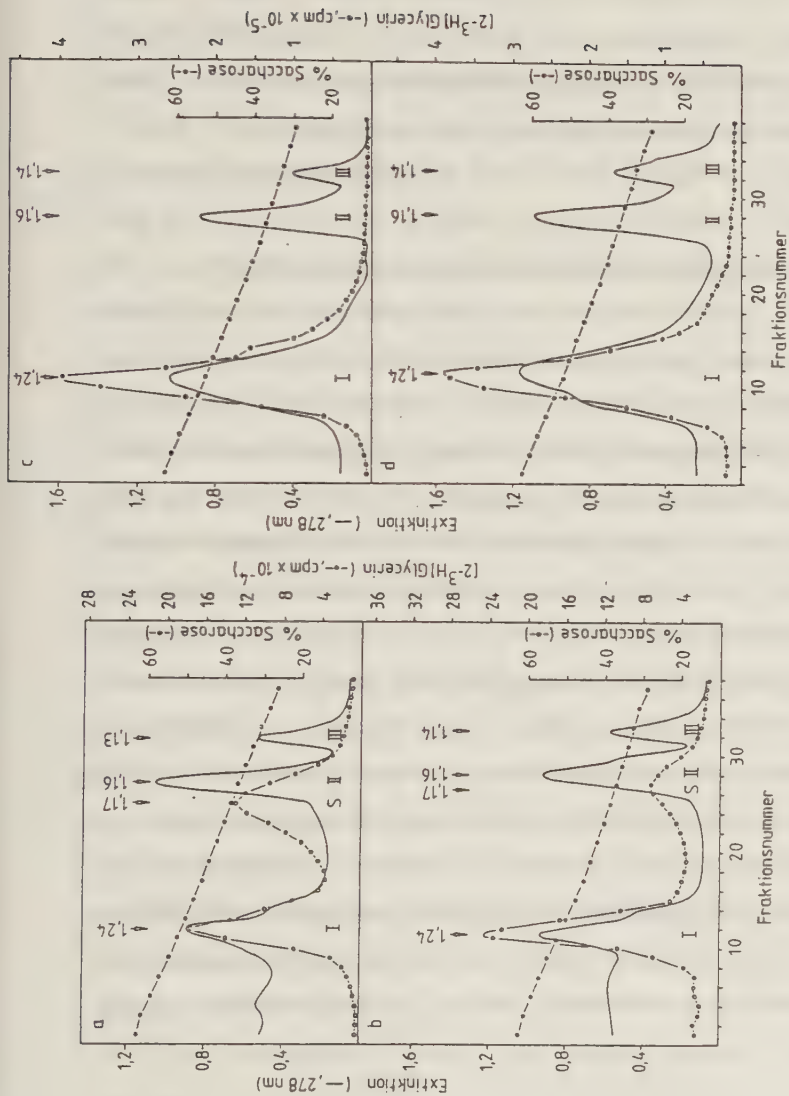


Abb. 13: Verteilung der radioaktiv markierten und unmarkierten Membranbruchstücke von *Escherichia coli* WF96 nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Die Bakterien wurden für 10 Sekunden mit [2-<sup>3</sup>H]glycerin "pulse"-markiert und entweder nach der OL- (a, b) oder nach der MD-Methode (c, d) zerstört. Die Membranpräparationen erfolgten entweder unmittelbar nach der Markierung (a, c) oder nach weiteren 10 Minuten Inkubation (b, d).

(Abb. 13a, b) bzw. der MD-Methode (Abb. 13c, d) zerstört worden waren, feststellbar. Im Gegensatz dazu war die Verteilung der radioaktiv markierten Lipide dieser Proben vollkommen verschieden. Bei Membranen von osmotisch lysierten Bakterien wurde die Radioaktivität in zwei Peaks fokussiert. Der eine dieser Peaks zeigte Koinzidenz mit Peak I, wohingegen der zweite Peak (Peak S) mit einer Schwimmdichte von etwa  $1,17 \text{ g/cm}^3$  zwischen Peak I und II lag. Ein Vergleich der Saccharosedichtegradientenzentrifugation von Membranen, die unmittelbar nach der radioaktiven Markierung (Abb. 13a) bzw. 10 Minuten später (Abb. 13b) isoliert wurden, führte zu der ersten Annahme, daß Peak S einen Synthesort von OM-Phospholipiden darstellt, denn die in Peak S enthaltene Radioaktivität nahm während des "chase" ab, ohne daß sich die in den Membranen enthaltene Gesamtaktivität veränderte. Beim Vergleich der Radioaktivitätsverteilungen von Membranen, die nach der OL- bzw. MD-Methode isoliert wurden, wird besonders deutlich, daß Peak S Membranbruchstücke enthält, die von den in Peak II und III enthaltenen verschieden sind und die darüber hinaus mit diesen in vivo nicht in direktem Kontakt stehen. Nach MD der Bakterien und Auftrennung ihrer Membranen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation waren die radioaktiv markierten Fragmente nur in einem Peak lokalisiert, der Koinzidenz mit Peak I aufwies, unabhängig davon, ob die Membranen unmittel-

telbar nach der radioaktiven Markierung oder nach weiteren 30 Minuten Inkubationsdauer isoliert wurden.

### 3.4.2 "Pulse-chase"-Markierung von antibiotikumvorinkubierten Bakterien und Zellzerstörung durch osmotischen Schock

#### 3.4.2.1 Dichtegradientenverteilung der Membranen

Durch die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche sollte die Kinetik des Einbaues von  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  in Peak-S- und Peak-I-Membranen aufgenommen werden. Die radioaktive Markierung der Bakterien erfolgte wiederum durch einen 10 Sekunden langen "pulse", nachdem die Zellen eine  $\text{OD}_{580}$  von ungefähr 0,5 erreicht hatten. Dann wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten Bakterien entnommen, unter Anwendung der OL-Methode zerstört und die isolierten Membranen durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Diese Experimente wurden parallel mit Bakterien durchgeführt, die in einer subinhibitorischen Konzentration ( $1/8$  der MHK) unterschiedlicher  $\beta$ -Laktamantibiotika und des Chinolons Ciprofloxacin vorinkubiert worden waren. In Abb. 14 ist der Einbau von Radioaktivität in die OM in Prozent von der insgesamt in die Membranen (Peak I und Peak S) eingebauten Aktivität aufgetragen gegen die Inkubationszeit nach der Zugabe von  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$ . Während der maximalen Inkubati-

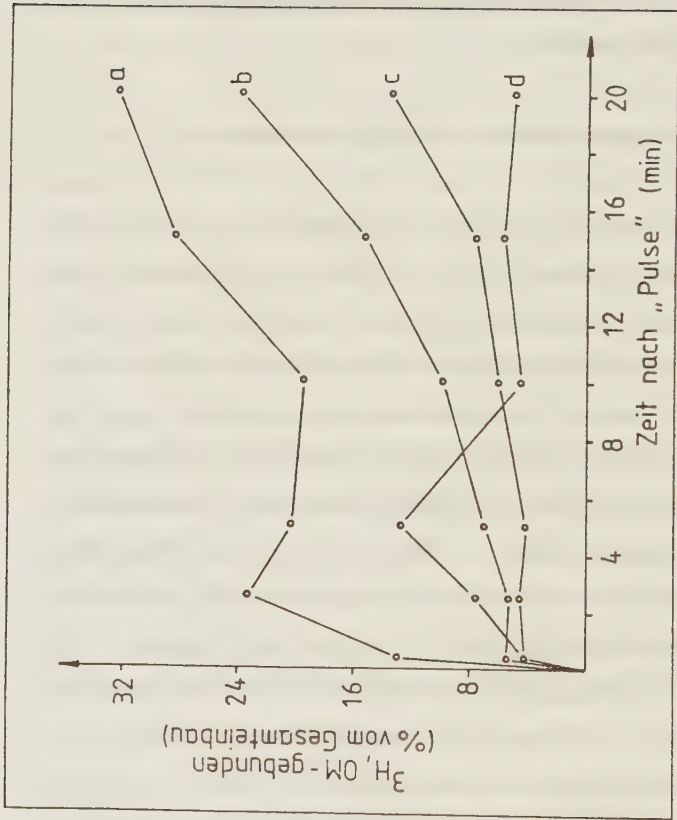
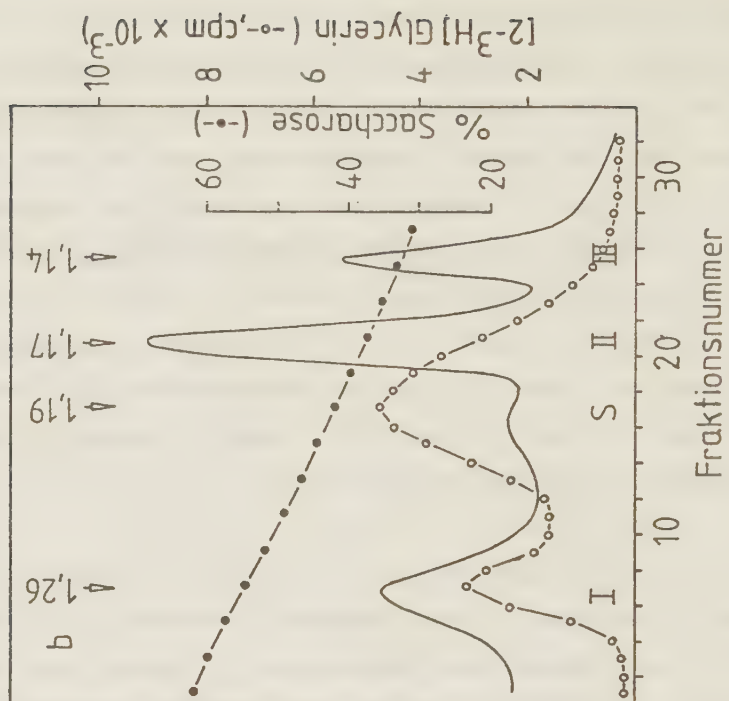
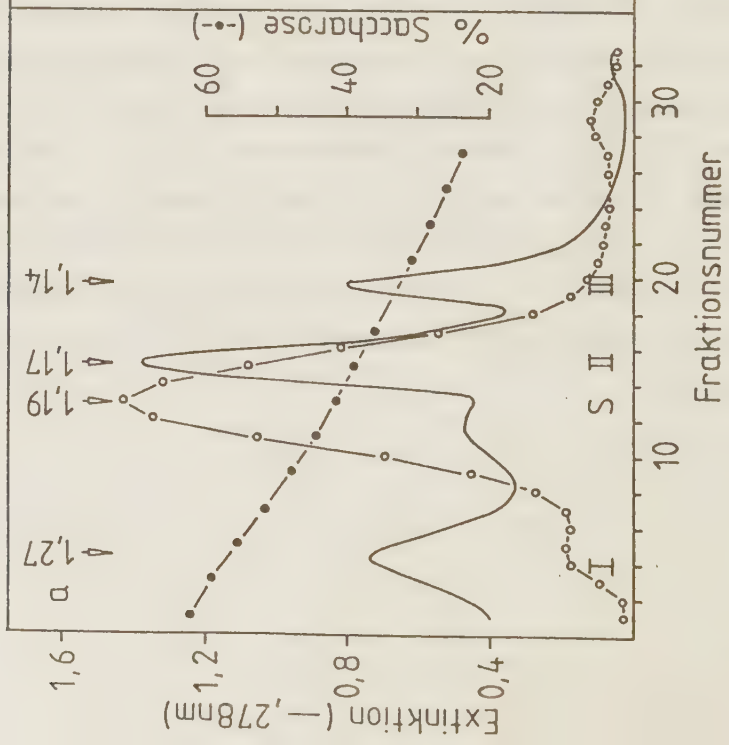


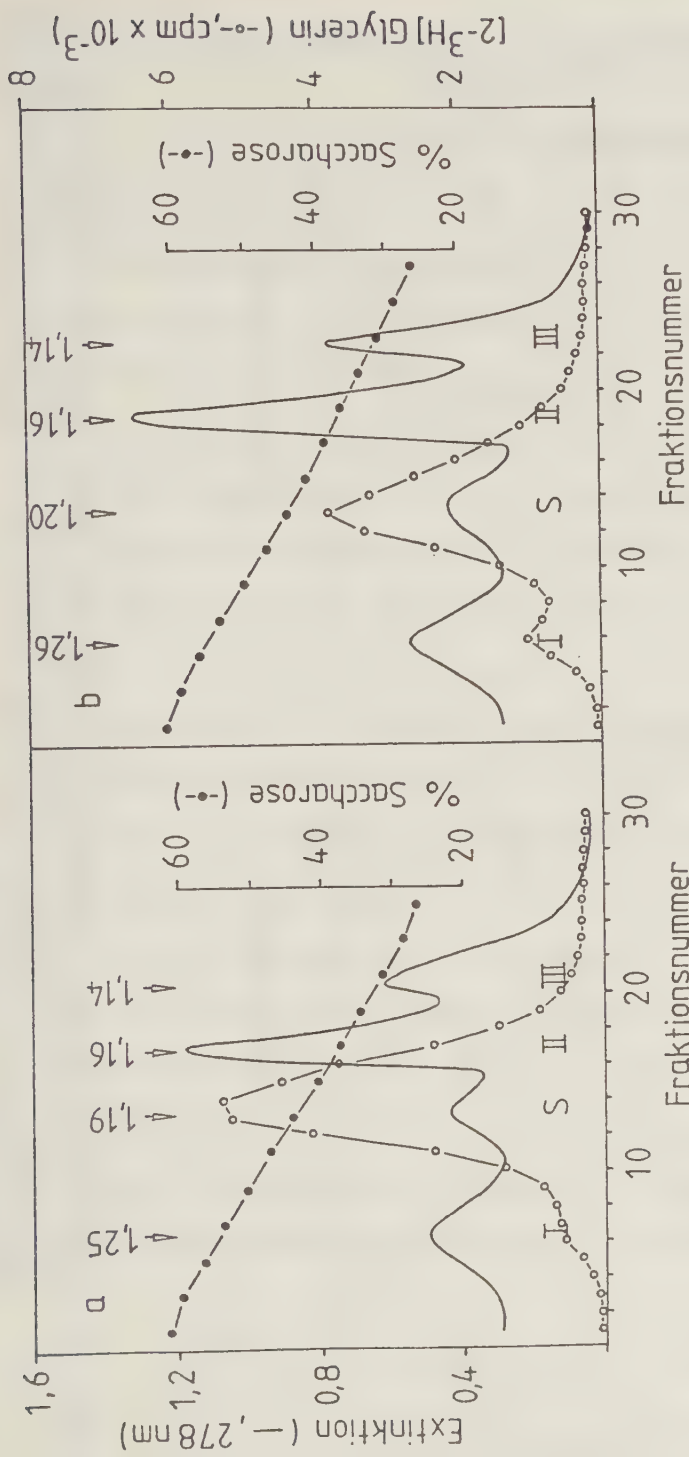
Abb. 14: Kinetik des Einbaus von  $^3\text{H}$  in die OM nach "pulse"-Markierung von *Escherichia coli* D509 mit [ $^3\text{H}$ ]Glycerin. Es wurden sowohl Antibiotikum-vorinkubierte ( $1/8$  MHK), als auch unbehandelte Bakterien verwendet. (Gesamte membrangebundene Radioaktivität = 100%).  
 a = Kontrolle      b = Aztreonam      c = Imipenem      d = Ciprofloxacin

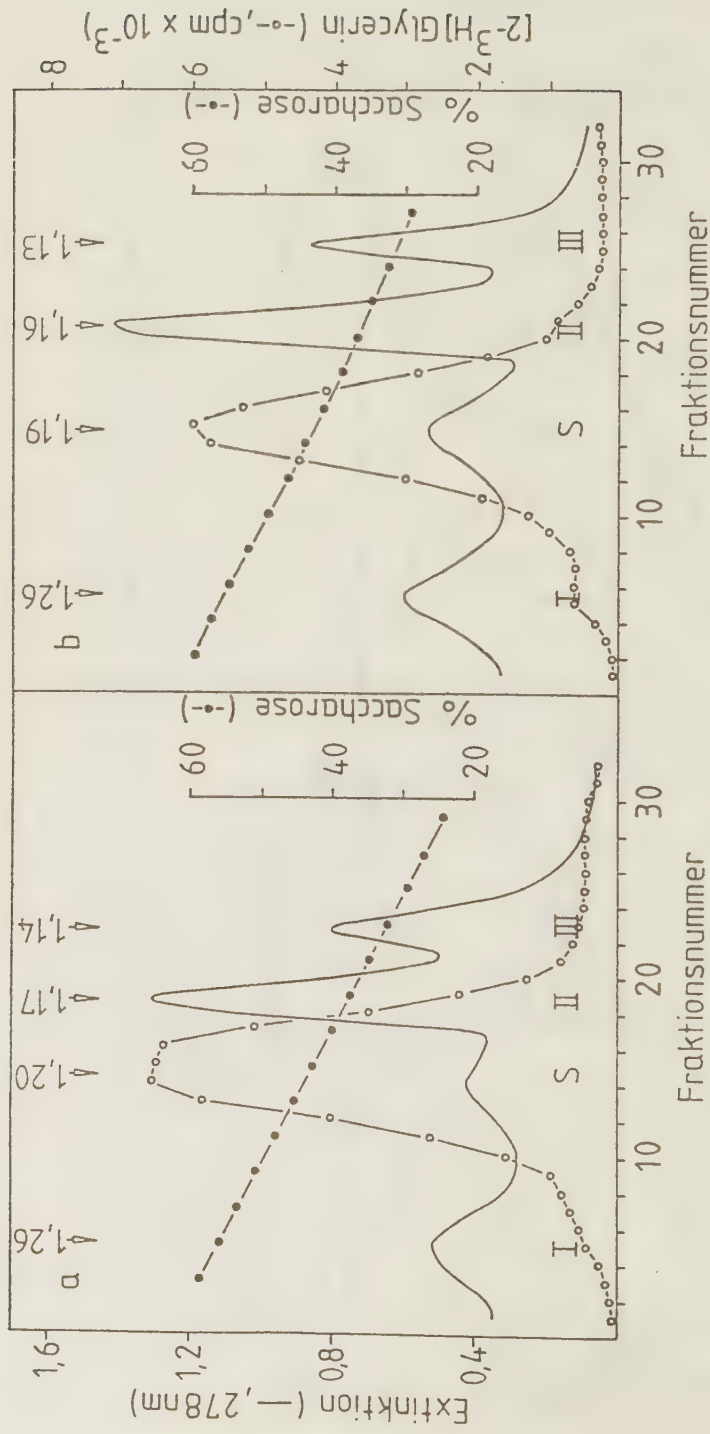
onszeit wurde jeweils weniger als 7% der aufgenommenen Radioaktivität von den Bakterien in den Überstand abgegeben. Aus Abb. 15 ist zu entnehmen, daß bei allen untersuchten Proben über die gesamte Inkubationszeit eine relative Zunahme der Peak I assoziierten Radioaktivität gemessen wurde. Im Vergleich zur antibiotikumunbehandelten Kontrolle hatten jedoch alle verwendeten Antibiotika einen inhibitorischen Einfluß auf den Transport des radioaktiv markierten Materials von Peak-S- nach Peak-I-Membranmaterial. Besonders deutlich wurde dieser Effekt nach Vorinkubation der Bakterien in Imipenem und Ciprofloxacin.

An dieser Stelle sei vermerkt, daß die Membrantrennung bei antibiotikumvorbehandelten Bakterien gegenüber der Kontrolle eine zusätzliche Membranbande mit einer Schwimmdichte von  $1,19 \text{ g/cm}^3$  bzw.  $1,20 \text{ g/cm}^3$  aufwies. Die entsprechende Radioaktivitätsverteilung des Peak-S-Membranmaterials erwies sich mit dieser Bande als koinzident (Abb. 15). Ob das bei  $\text{OD}_{280}$  gemessene Membranmaterial jedoch mit dem radioaktiv markierten identisch ist, erscheint zumindest fraglich, da das die Radioaktivität enthaltende Membranmaterial auch dann an dieser Stelle im Gradienten nachgewiesen wurde, wenn dies durch Bestimmung der  $\text{OD}_{280}$  nicht möglich ist.



[2-<sup>3</sup>H] Glycerin (---, cpm  $\times 10^{-3}$ )





III

Abb. 15: Verteilung der radioaktiv markierten und unmarkierten Membranbruchstücke von *Escherichia coli* D509. Die Bakterien wurden in Gegenwart von 1/8 MHK Aztreonam (I), Imipenem (II) und Ciprofloxacin (III) angezüchtet und für 10 Sekunden mit  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  "pulse"-markiert. Die Membranpräparationen erfolgten entweder unmittelbar nach der "Pulse"-Markierung (a) oder nach weiteren 30 min. Inkubation (b).

#### 3.4.2.2 Die Zusammensetzung der äußeren Membran

Aus früheren Untersuchungen (88) war bekannt, daß das Wachstum eines *E. coli*-Stammes in Gegenwart subinhibitorischer Konzentrationen von  $\beta$ -Laktamantibiotika und Ciprofloxacin keinen Einfluß auf die Qualität der Haupt-OM-Komponenten hat. Danach führten diese Antibiotika weder zu veränderten SDS-PAGE-Mustern von OM-Proteinen und LPS noch zu Veränderungen in der Verteilung von OM-Phospholipiden nach deren Dünnschichtchromatographie. Vor dem Hintergrund dieser Befunde und dem eben beschriebenen inhibitorischen Einfluß dieser Antibiotika auf den Transport von Phospholipiden in die OM waren antibiotikumindizierte quantitative Veränderungen der OM zu erwarten. Aus diesem Grunde wurden die in den OM-Präparationen vorhandenen Mengen an Phospholipidphosphat, KDO und DAP (zur Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Peptidoglykanbruchstücke) bestimmt und auf die Proteinmenge bezogen. Das Ergebnis der Bestimmung ist in Tab. 6 zusammengefaßt. Alle untersuchten Antibiotika induzierten konzentrationsabhängig eine Verkleinerung des Phospholipidphosphat/Protein-Verhältnisses. Der stärkste Effekt wurde mit Imipenem erreicht, das bereits bei der Konzentration von 1/8 der MHK bei *E. coli* WF96 diesen Quotienten um 26% und bei *E. coli* D509 um über 50% reduzierte. Die Frage, ob die Abnahmen des Phospholipidgehaltes der äußeren Membranen durch einen erhöhten Einbau von Proteinen, Lipopolysaccharid oder beiden Bausteinen ausgeglichen

Tab. 6: Zusammensetzung der OM der Stämme WF96 und D509 nach Vorinkubation in subinhibitorischen Konzentrationen unterschiedlicher Antibiotika

a) WF96

|               |            | $\mu\text{g KDO/}$<br>$\text{mg Protein}$ | $\text{nmol PL-P/}$<br>$\text{mg Protein}$ | $\text{nmol DAP/}$<br>$\text{mg Protein}$ |
|---------------|------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Kontrolle     |            | 17,58                                     | 290,36                                     | 7,88                                      |
| Ciprofloxacin | (1/4 MHK)  | 18,40                                     | 244,00                                     | 10,40                                     |
| Ciprofloxacin | (1/8 MHK)  | 20,83                                     | 244,36                                     | 9,97                                      |
| Ciprofloxacin | (1/12 MHK) | 19,56                                     | 261,01                                     | 9,64                                      |
| Imipenem      | (1/8 MHK)  | 18,57                                     | 213,88                                     | 8,92                                      |
| Imipenem      | (1/12 MHK) | 22,89                                     | 234,03                                     | 8,60                                      |
| Latamoxef     | (1/12 MHK) | 18,06                                     | 243,90                                     | 9,61                                      |
| Latamoxef     | (1/16 MHK) | 24,81                                     | 306,56                                     | 10,50                                     |

b) D509

|               |            | $\mu\text{g KDO/}$<br>$\text{mg Protein}$ | $\text{nmol PL-P/}$<br>$\text{mg Protein}$ | $\text{nmol DAP/}$<br>$\text{mg Protein}$ |
|---------------|------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Kontrolle     |            | 26,10                                     | 251,26                                     | 7,42                                      |
| Ciprofloxacin | (1/8 MHK)  | 22,98                                     | 195,46                                     | 10,77                                     |
| Ciprofloxacin | (1/12 MHK) | 30,31                                     | 265,78                                     | 9,30                                      |
| Imipenem      | (1/8 MHK)  | 24,56                                     | 125,22                                     | 11,16                                     |
| Imipenem      | (1/12 MHK) | 29,72                                     | 174,17                                     | 9,41                                      |
| Latamoxef     | (1/8 MHK)  | 28,56                                     | 188,47                                     | nb                                        |
| Latamoxef     | (1/12 MHK) | 22,56                                     | 202,75                                     | 10,33                                     |

nb Nicht bestimmt

DAP = Diaminopimelinsäure

KDO = 2-Keto-3-deoxy-Octonsäure

PL-P = Phospholipidphosphat

werden, kann nicht klar beantwortet werden. Veränderungen im Gehalt an Phospholipid sind, da es sich um die quantitativ schwächste Komponente der OM handelt, nur schwer mit Veränderungen des Protein- bzw. des LPS-Gehaltes zu korrelieren.

Auffällig ist darüber hinaus eine bei beiden untersuchten E. coli-Stämmen gemessene, von der Antibiotikumkonzentration abhängige Erhöhung des DAP/Protein-Verhältnisses. Aus Tab. 7 geht hervor, daß, mit Ausnahme von DAP, bei den übrigen Aminosäuren keine Antibiotikum-induzierten Veränderungen feststellbar waren. Dies bedeutet, daß die verwendeten Antibiotika an der bakteriellen Zellhülle solche Veränderungen induzieren, daß nach der Zellzerstörung durch die OL-Methode mehr Peptidoglykan-Bruchstücke über die gebundene Form des Braun'schen Lipoproteins mit der OM verbunden bleiben. Als Ursachen für diesen Effekt sind folgende Möglichkeiten denkbar: 1. Die benutzten Antibiotika führten zu einer Veränderung im Verhältnis von gebundenem und freiem Lipoprotein zugunsten der gebundenen Form. 2. Durch die Antibiotika wurden Veränderungen in der Peptidoglykan-Struktur herbeigeführt, die diese gegenüber der hydrolytischen Wirkung von Lysozym resistenter machten. In diesem Zusammenhang ist ein weiterer Befund interessant. Die Vorinkubation von Bakterien in Gegenwart von  $\beta$ -Laktamantibiotika kann in höheren subinhibitorischen Konzentrationen dazu führen, daß nach osmotischer Lyse der Zellen

Tab. 7: Aminosäurezusammensetzung der OM der Stämme WF96 und D509  
nach Vorinkubation in subinhibitorischen Konzentrationen  
unterschiedlicher Antibiotika

|     | WF96   |        |        |        | D509   |        |        |        |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|     | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      |
| Asp | 144,58 | 138,46 | 143,77 | 144,27 | 147,59 | 146,67 | 148,71 | 154,58 |
| Thr | 81,21  | 78,50  | 81,06  | 76,25  | 79,46  | 76,55  | 84,79  | 83,30  |
| Ser | 75,20  | 75,82  | 77,62  | 78,50  | 75,62  | 72,34  | 76,90  | 75,34  |
| Glu | 130,55 | 133,58 | 138,94 | 140,94 | 132,21 | 131,48 | 125,77 | 128,35 |
| Gly | 81,61  | 72,96  | 75,50  | 78,73  | 84,28  | 79,21  | 76,30  | 82,05  |
| Ala | 94,29  | 84,94  | 90,38  | 92,41  | 94,55  | 90,61  | 87,11  | 91,83  |
| Val | 62,76  | 65,50  | 65,88  | 67,22  | 61,73  | 62,19  | 64,19  | 64,92  |
| Dap | 1,86   | 2,45   | 2,10   | 2,26   | 1,74   | 2,54   | 2,63   | -      |
| Ile | 41,43  | 44,50  | 44,12  | 43,77  | 42,37  | 42,93  | 43,79  | 42,19  |
| Leu | 78,41  | 75,85  | 79,23  | 79,13  | 80,65  | 77,17  | 74,72  | 75,57  |
| Tyr | 24,54  | 31,68  | 31,45  | 27,37  | 21,15  | 39,64  | 34,85  | 30,89  |
| Phe | 39,90  | 43,13  | 42,95  | 41,71  | 45,85  | 48,81  | 47,78  | 43,76  |
| Lys | 67,29  | 74,17  | 53,30  | 54,98  | 58,98  | 58,04  | 57,40  | 56,54  |
| His | 17,91  | 18,71  | 17,21  | 17,01  | 18,42  | 17,77  | 17,42  | 17,37  |
| Arg | 55,27  | 56,47  | 53,51  | 53,90  | 54,21  | 53,48  | 55,82  | 49,64  |

Alle Angaben in nmol Aminosäure/ $\mu$ mol Gesamt-Aminosäure

- 1, 5 = unbehandelte Probe
- 2, 6 = 1/4, 1/8 MHK Ciprofloxacin
- 3, 7 = 1/8 MHK Imipenem
- 4, 8 = 1/12, 1/8 MHK Latamoxef

und Auftrennung der isolierten Membranen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation konzentrationsabhängig immer weniger CM-Material isolierbar ist (88). Dieser Effekt kann bis zum vollständigen Fehlen der CM-Peaks fortgesetzt werden. Er ist wahrscheinlich, wie im Falle stationärer Zellen, damit zu erklären, daß die Bakterien aufgrund einer ineffizienten Hydrolyse des Peptidoglykans durch Lysozym nicht mehr effizient lysiert werden können. Im Gegensatz dazu wird jedoch während des osmotischen Schocks trotzdem OM-Material freigesetzt. Neben Veränderungen im DAP-Gehalt wurden bei den übrigen Aminosäuren keine auffälligen Unterschiede zwischen antibiotikumvorinkubierten Bakterien und den entsprechenden unbehandelten Kontrollen festgestellt.

#### **3.4.3      Kontinuierliche Markierung über Nacht und Zellzerstörung durch osmotischen Schock**

Der Befund, daß von stationären Zellen unter Verwendung der OL-Methode zur Zellzerstörung kein CM-Material (Peak II, III) isoliert werden kann, führte zu der Frage nach der Dichtegradientenverteilung der radioaktiv markierten Membranen dieser Zellen. Bei topologischer Zugehörigkeit des Peak-S-Materials zur CM war bei solchen spätstationären Bakterien ein simultan mit dem Fehlen des CM-Materials auftretendes Fehlen an isolierbarem Peak-S-Material zu erwarten. Zur Klärung der Frage wurde folgendes Experiment

durchgeführt: Eine Übernachtskultur von *E. coli* D509 wurde 1:100 in Mueller-Hinton-Bouillon verdünnt und nach Zugabe von 80  $\mu\text{Ci}/100\text{ ml}$   $[[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  16,5 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien, die eine Zellzahl von  $2,12 \times 10^9/\text{ml}$  erreicht hatten, nach der OL-Methode zerstört, und die isolierten Membranen wurden durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Abb. 16 zeigt das bei  $\text{OD}_{280}$  gemessene Membranprofil und die Verteilung des radioaktiv markierten Membranmaterials. Das Membrangemisch bestand, wie dies auch in früheren Untersuchungen gefunden wurde, zum größten Teil aus äußeren Membranen, die im Gradienten eine scharfe Bande mit einer Schwimmdichte von  $1,27\text{ g/cm}^3$  (Peak Ib) bildeten. Von den drei getrennten, den Hauptteil der Radioaktivität enthaltenden Peaks erwies sich einer als koinzident mit dem Haupt-OM-Peak. Die beiden übrigen hatten Schwimmdichten von  $1,25$  und  $1,19\text{ g/cm}^3$  und entsprechen damit den mit Peak Ic und Peak S bezeichneten Membranfraktionen.

#### 3.4.4      **Kontinuierliche Markierung über Nacht, Rekultivierung in kaltem Medium und Zellzerstörung durch osmotischen Schock**

Der im folgenden beschriebene Versuch diente zur Klärung der Frage, ob die radioaktiv markierten Lipide von Bakterien, die von der frühlogarithmischen Wachstumsphase an

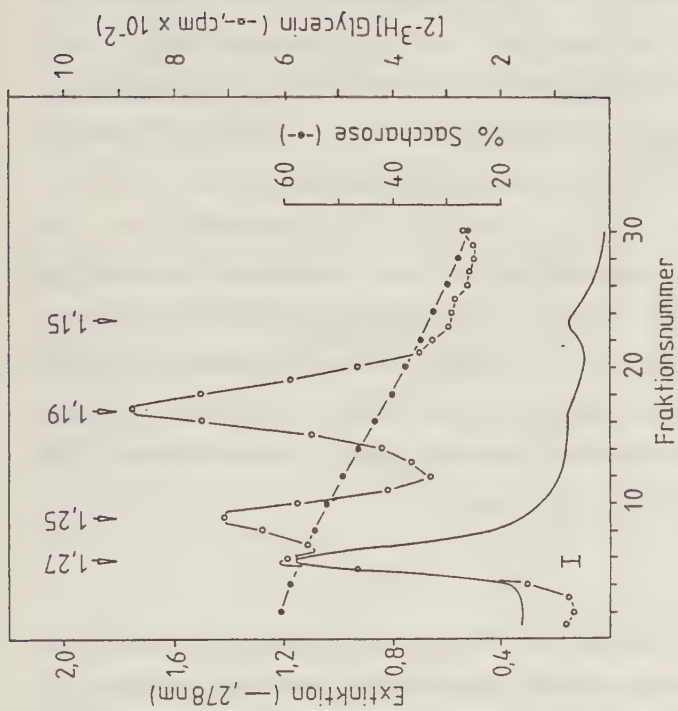


Abb. 16: Verteilung der radioaktiv markierten und unmarkierten Membranbruchstücke von *Escherichia coli* D509 nach Übernachtwachsen in Gegenwart von [2-<sup>3</sup>H]Glycerin. Die Zellzerstörung erfolgte nach der OL-Methode.

über Nacht in  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  inkubiert wurden, nach Rekultivierung in frischem Medium einen Teil der radioaktiven Lipide an die CM abgeben, oder ob die CM-Lipide auch in diesem Fall nicht markiert werden. Der Versuch unterscheidet sich deshalb vom vorhergehend beschriebenen dadurch, daß die Bakterien nach der Markierung, also nachdem sie über Nacht in  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  ( $80\text{ }\mu\text{Ci}$ ) gewachsen waren, zentrifugiert und das Sediment aus Bakterien in "kaltem" Mueller-Hinton-Medium resuspendiert wurde, so daß die Anfangs- $\text{OD}_{580}$  0,2 betrug. Diese Suspension wurde dann für 120 Minuten inkubiert, bis eine  $\text{OD}_{580}$  von 0,8 erreicht war. Die Zellen wurden anschließend nach der OL-Methode zerstört und ihre Membranen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Das Ergebnis der Membrantrennung ist in Abb. 17 dargestellt. Es wurde wiederum nur Peak Ib, Peak Ic und Peak-S-Material markiert, nicht jedoch Peak-II- und Peak-III-Material, also die CM.

#### **3.4.5      Kontinuierliche Markierung unter Verwendung unterschiedlicher Aktivitäten bzw. spezifischer Aktivitäten und Zellzerstörung durch osmotischen Schock**

In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob eine Markierung der CM-Lipide erreicht werden kann, wenn der Einsatz an  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  erhöht bzw. der Glycerin-Konzentrations-

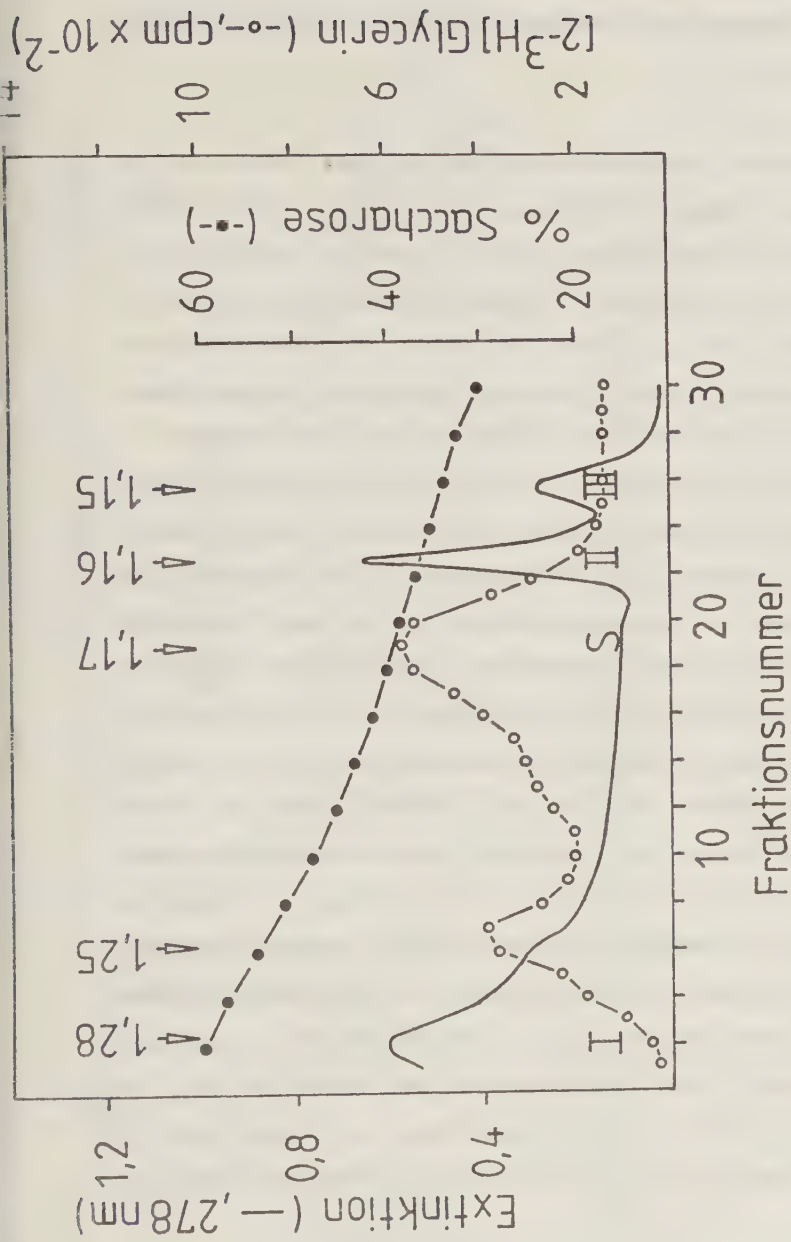


Abb. 17: Verteilung der radioaktiv markierten und - unmarkierten Membranbruchstücke von *Escherichia coli* D509 nach Übernachtwachstum in Gegenwart von [2-<sup>3</sup>H]Glycerin und Reaktivierung in frischem Medium. Die Bakterien wurden nach der OL-Methode zerstört.

gradient zwischen dem externen Medium und dem Zellinhalt durch Verdünnung des radioaktiven mit "kaltem" Glycerin vergrößert wird.

Dazu wurde eine Übernachtskultur von E. coli WF96 1:400 in Mueller-Hinton-Medium verdünnt, und zu jeweils 100 ml-Aliquots dieser Kultur wurden 40  $\mu\text{Ci}$  (Probe A) oder 400  $\mu\text{Ci}$  (Probe B)  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  (1 Ci/mmol) pipettiert. Ein drittes Aliquot (100 ml) wurde mit 40  $\mu\text{Ci}$   $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  und 2,2 mg "kaltem" Glycerin (Probe C) versetzt, um den Glycérinkonzentrationsgradienten zwischen intra- und extrazellulärem Milieu und damit die Aufnahme von Glycerin zu erhöhen. Das Zellwachstum wurde dann bis zu einer  $\text{OD}_{580}$  von ungefähr 0,5 gemessen. Anschließend wurden die Bakterien unter Anwendung der OL-Methode zerstört. In Tab. 8 sind die in den Lysaten und den Überständen nach Ultrazentrifugation der entsprechenden Lysate gemessenen Aktivitäten und die daraus für die Sedimente errechneten Aktivitäten dargestellt. Bei Zusatz von 400  $\mu\text{Ci}$   $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  zum Medium wurde 10 mal soviel Radioaktivität von den Bakterien gebunden als bei Zusatz von 40  $\mu\text{Ci}$   $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$ . In diesem Aktivitätsbereich besteht also ein linearer Zusammenhang zwischen der Zugabe und der Aufnahme von radioaktivem Material. In diesen Proben waren ungefähr 30% der angebotenen Radioaktivität nach Zentrifugation der Bakterien mit den Zellen assoziiert. Nach der Zerstörung der Zellen und Ultrazentrifugation der Lyseflüssigkeit konnten noch etwa 11%

Tab. 8: Einbau von [2-<sup>3</sup>H]Glycerin nach kontinuierlicher Markierung der Bakterien (WF96) in Gegenwart unterschiedlicher Aktivitäten bzw. spezifischer Aktivitäten

|           | Radioaktivität (cpm)       |      |                             |                             |
|-----------|----------------------------|------|-----------------------------|-----------------------------|
|           | A                          | B    |                             | C                           |
|           |                            | %    | %                           | %                           |
| Lysat     | 9,034200 x 10 <sup>6</sup> | 100  | 9,0754282 x 10 <sup>7</sup> | 4,9915425 x 10 <sup>6</sup> |
| Überstand | 1,005375 x 10 <sup>6</sup> | 11,1 | 9,8819175 x 10 <sup>6</sup> | 6,9179250 x 10 <sup>5</sup> |
| Sediment  | 8,028825 x 10 <sup>6</sup> | 88,9 | 8,0872364 x 10 <sup>7</sup> | 4,2997500 x 10 <sup>6</sup> |

A = 100 ml Kultur + 40 µCi [2-<sup>3</sup>H]Glycerin  
 B = 100 ml Kultur + 400 µCi [2-<sup>3</sup>H]Glycerin  
 C = 100 ml Kultur + 40 µCi [2-<sup>3</sup>H]Glycerin in 2,2 mg "kaltem" Glycerin

der Radioaktivität im Überstand nachgewiesen werden, d.h. etwa 89% der Radioaktivität waren membrangebunden. Die Verdünnung des radioaktiven Glycerins mit "kaltem" Glycerin bewirkte eine erhebliche Steigerung der Aufnahme von Glycerinmolekülen. Obgleich das radioaktive Glycerin etwa 600-fach verdünnt zugegeben wurde, war die Aufnahme von radioaktivem Glycerin nur um etwa 50% im Vergleich zur Probe, der unverdünntes Glycerin zugegeben worden war (Probe A), vermindert. Auch in diesem Fall war mit etwa 86% der größte Anteil der zellassozierten Radioaktivität membrangebunden.

Die Verteilung der Membranen dieser Proben, nach deren Auftrennung mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation, ist in Abb. 18 dargestellt. Bei keiner der drei Proben wurde eine Koinzidenz der Radioaktivitätsverteilung mit Peak-II- bzw. Peak-III-Material festgestellt. Die radioaktiv markierten Membranen waren in allen drei Proben in jeweils zwei Hauptpeaks mit Schwimmdichten von etwa 1,25 und 1,16 g/cm<sup>3</sup> fokussiert. Der jeweils dichtere Peak erwies sich bei der Probe mit der höchsten radioaktiven Markierung als vollkommen koinzident mit Peak-I-Membranmaterial (Abb. 18b). In den anderen Fällen war der Verlauf der allgemeinen Membranverteilung (OD<sub>280</sub>) von Peak I mit der Verteilung der radioaktiv markierten Membranbruchstücke nicht vollkommen koinzident (Abb. 18a, c).

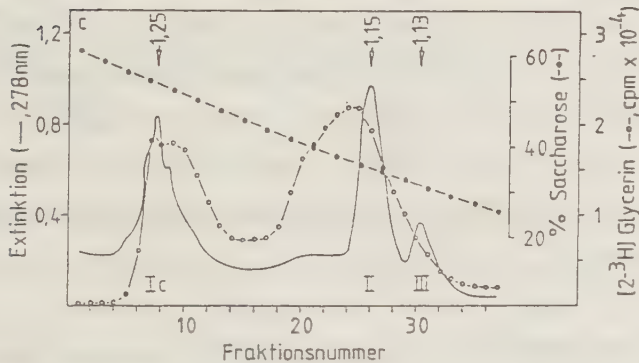
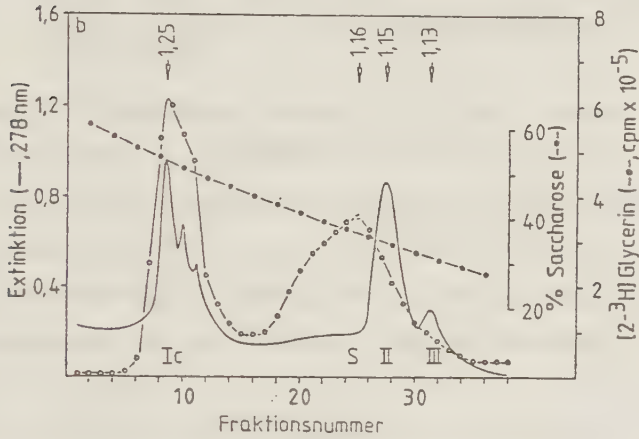
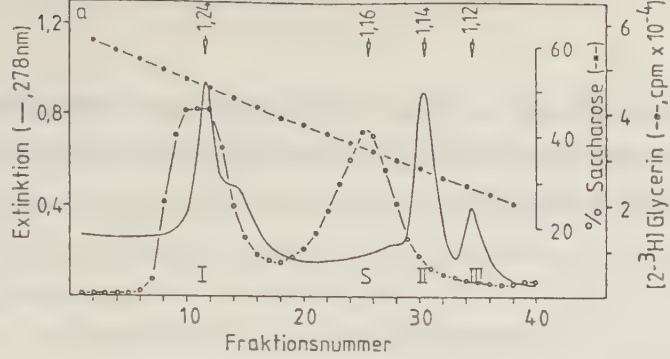


Abb. 18: Verteilung der radioaktiv markierten und unmarkierten Membranbruchstücke von *Escherichia coli* WF96 im Saccharosedichtegradienten. Die Bakterien wurden kontinuierlich mit  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  markiert. Folgende Aktivitäten wurden verwendet: 0,4  $\mu\text{Ci/ml}$  (a), 4  $\mu\text{Ci/ml}$  (b) und 0,4  $\mu\text{Ci/ml}$  nach Verdünnung mit 22  $\mu\text{g}$  "kaltem" Glycerin (c).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß unter diesen Versuchsbedingungen die CM-Lipide der Bakterien nicht radioaktiv markiert werden.

#### 3.4.6      **Doppelmarkierung mit [2-<sup>3</sup>H]Glycerin und L-[U-<sup>14</sup>C]Aminosäuren und Zellzerstörung durch osmotischen Schock**

Das Hauptziel des im folgenden beschriebenen Experimentes war die Ermittlung und der Vergleich der Lipid/Protein-Quotienten in den Haupt-Membranfraktionen (I, S, II, III), nach kontinuierlicher Doppelmarkierung der Bakterien mit radioaktivem Glycerin und radioaktiven Aminosäuren und anschließender Isolierung der Membranen nach der OL-Methode.

Dazu wurde eine 1:400 in Mueller-Hinton-Bouillon verdünnte Übernachtskultur (100 ml) von E. coli WF96, die 40 µCi [2-<sup>3</sup>H]Glycerin (1 Ci/mmol) und 500 µCi L-[U-<sup>14</sup>C]Aminosäuren enthielt, bis zum Erreichen einer OD<sub>580</sub> von etwa 0,5 unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien nach der OL-Methode zerstört und die Membranbruchstücke einer Saccharosedichtegradientenzentrifugation unterzogen.

Von dem angebotenen Glycerin blieb nach der Sedimentation der Bakterien etwa 30%, von den Aminosäuren weniger als

0,1% mit den Zellen assoziiert. Nach der Zerstörung der Bakterien erwies sich ungefähr 90% des  $^3\text{H}$ -markierten Materials und etwa 30% des  $^{14}\text{C}$ -markierten Materials als aus dem Lysat durch Ultrazentrifugation (1 h, 130000 g) sedimentierbar (Tab. 9).

Tab. 9: Einbau von  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  und  $\text{L-}[U\text{-}^{14}\text{C}]\text{Aminosäuren}$  in Zellhüll- und lösliche Bestandteile von *E. coli* WF96

| Radioaktivität (cpm) <sup>2</sup> |                                        |                |                                                        |                |
|-----------------------------------|----------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------|----------------|
|                                   | $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$ | % <sup>1</sup> | $\text{L-}[U\text{-}^{14}\text{C}]\text{-Aminosäuren}$ | % <sup>1</sup> |
| Lysat                             | $9,3437925 \times 10^6$                | 100            | $8,217825 \times 10^5$                                 | 100            |
| Überstand                         | $9,1890750 \times 10^5$                | 9,8            | $5,788125 \times 10^5$                                 | 70,4           |
| Sediment                          | $8,4248850 \times 10^6$                | 90,2           | $2,429700 \times 10^5$                                 | 29,6           |

<sup>1</sup> % = Prozentualer Anteil der Radioaktivität vom Lysat

<sup>2</sup> Ergebnisse beziehen sich auf 100 ml Bakterienkultur (WF96) mit einer  $\text{OD}_{580}$  von etwa 0,5

Die Auftrennung des Membrangemisches nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation ist in Abb. 19 dargestellt. Für die jeweiligen Spitzenfraktion von Peak Ic, Id, S, II und III wurden folgende  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisse bestimmt: 141,1 (Ic); 130,0 (Id); 137,0 (S); 82,4 (II); 63,2 (III). Das Li-

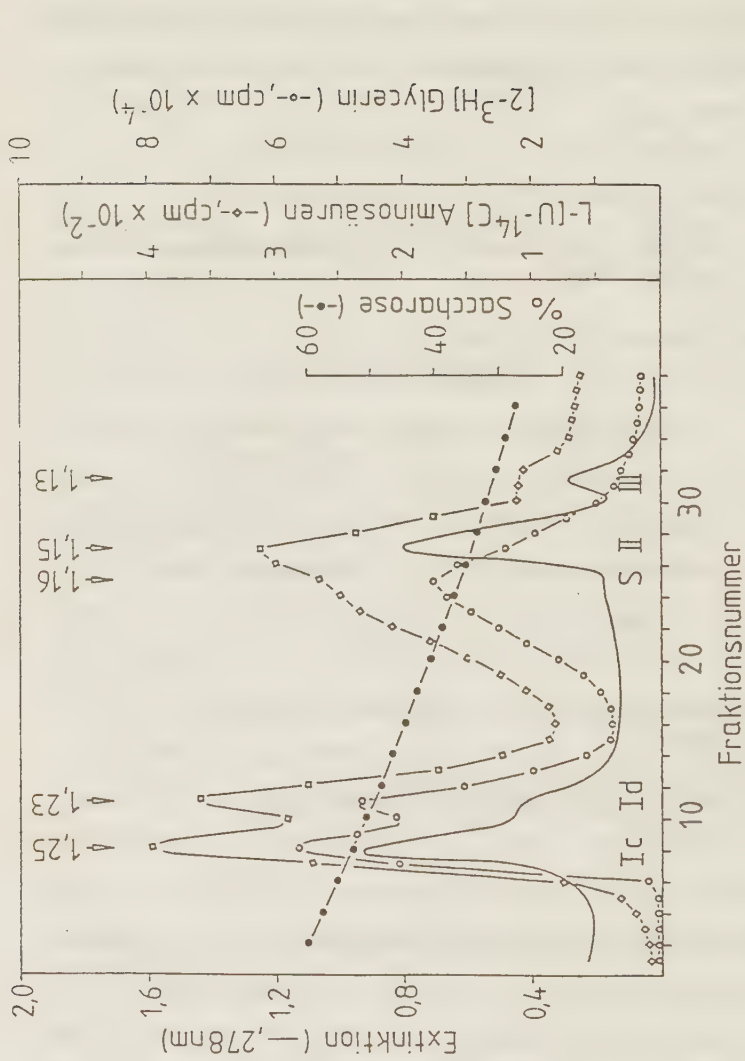


Abb. 19: Verteilung der radioaktiv markierten und unmarkierten Membranbruchstücke von *Escherichia coli* WF96 im Saccharosedichtegradienten. Die Bakterien wurden kontinuierlich mit  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  und  $\text{L}\text{-}[\text{U}\text{-}^{14}\text{C}]\text{Aminosäuren}$  markiert und nach der OL-Methode zerstört.

pid/Protein-Verhältnis in Peak-S-Membranen entspricht damit dem für Peak-I-Membranen ermittelten, wohingegen die in Peak II und III gemessenen Tritiumaktivität erheblich niedriger liegt als in Peak I und Peak S und mit größter Wahrscheinlichkeit von einer Kontamination dieser Membranbruchstücke mit Peak-S-Membranen herrührt (Abb. 19). Auch dieser Befund spricht für die Richtigkeit der Annahme, Daß Peak-S-Membranen biogenetisch enger mit Peak I (OM) als mit Peak-II- und Peak-III-Membranen (CM) verwandt sind.

#### 3.4.7 Isolierung und Trennung von Membranbruchstücken bei 25 °C

Es ist bekannt, daß das Einfrieren und Auftauen von chemisch heterogen zusammengesetzten Strukturen, wie z.B. Membranen, zur Umorganisation und Segregation der Bausteine führen kann. Aus diesem Grunde wurde folgendes Experiment durchgeführt. Eine Übernachtskultur von E. coli D509 wurde 1:100 in Mueller-Hinton-Bouillon, die 70  $\mu\text{Ci}$   $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$  enthielt, verdünnt und bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{580}$  von 0,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aus jeweils 100 ml Kulturmedium nach der OL-Methode und der MD-Methode zerstört und die Membranen durch Dichtegradientenzentrifugation getrennt. Es wurde bei sämtlichen Versuchsschritten so gut wie möglich auf die Einhaltung einer Temperatur von 25 °C geachtet. Es muß an dieser

Stelle besonders angemerkt werden, daß die Bakterien nicht eingefroren wurden, sondern gleich nach der Zentrifugation weiter bearbeitet wurden.

Das Ergebnis der beiden Membrantrennungen ist in Abb. 20 dargestellt. Im Vergleich zu vorherigen Membrantrennungen wurde unter diesen Versuchsbedingungen nach Zerstörung der Bakterien durch osmotischen Schock mehr Peak-II- und Peak-III-Membranmaterial und weniger Peak-I-Material isoliert. Die radioaktiv markierten Membranen bildeten wiederum zwei Peaks, wobei derjenige mit der geringeren Schwimmdichte nicht, wie bei den anderen Trennungen, eine höhere Schwimmdichte als Peak II besaß, sondern zwischen Peak II und III zu einem relativ symmetrischen Peak fokussiert wurde. Daß es sich hier jedoch nur um eine Überlagerung radioaktiv markierter und nicht markierter Membranbruchstücke handelt, wird beim Vergleich von Abb. 20a) und Abb. 20b) deutlich. Die Bakterien aus derselben Kultur wurden in diesem Fall durch MD zerstört und durch Gradientenzentrifugation aufgetrennt. Die in diesem Gradienten enthaltene Radioaktivität macht etwa 82% des in Abb. 20a) dargestellten Gradienten aus. Es ist klar erkennbar, daß das radioaktiv markierte Membranmaterial eng mit Peak-I-Material zusammenhängt. Es verteilte sich auf Membransubfraktionen mit Schwimmdichten von  $1,27 \text{ g/cm}^3$ ,  $1,25 \text{ g/cm}^3$ ,  $1,24 \text{ g/cm}^3$ , die damit den bereits zu Beginn des Ergebnisteils beschriebenen Peak-I-Sub-

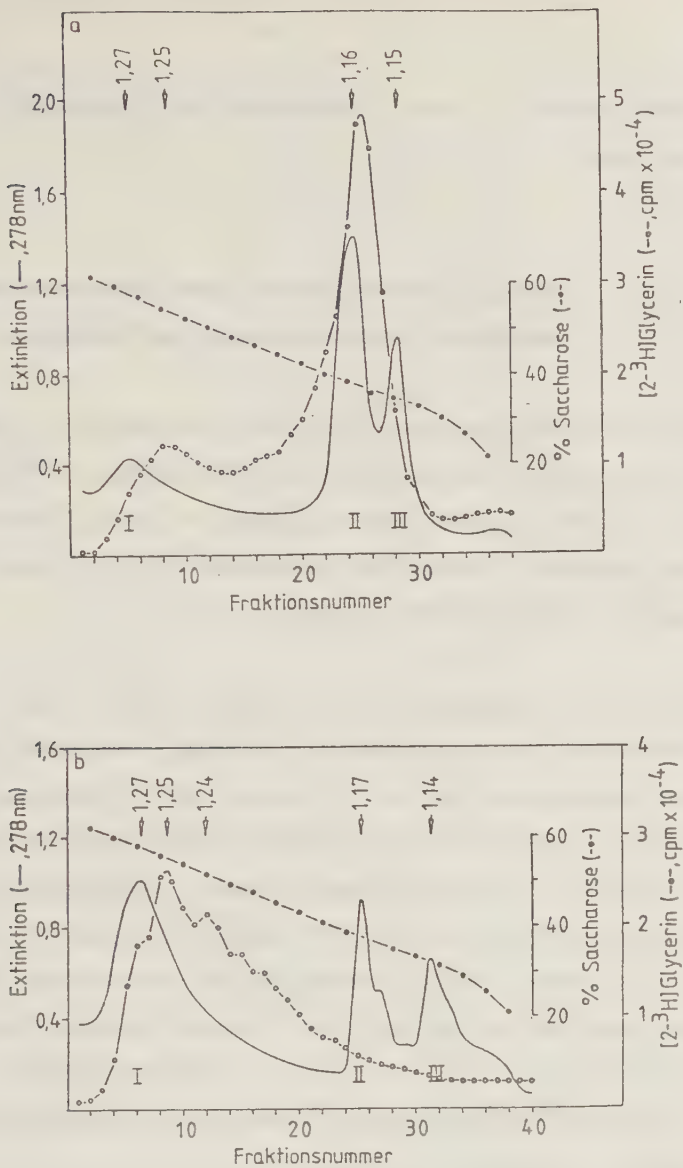


Abb. 20: Verteilung der radioaktiv markierten und unmarkierten Membranbruchstücke von *Escherichia coli* D509 im Saccharosedichtegradienten. Die Bakterien wurden kontinuierlich mit  $[2-^3H]Glycerin$  markiert und nach der OL- (a) bzw. MD-Methode (b) zerstört. Sämtliche Präparationsschritte erfolgten bei 25 °C.

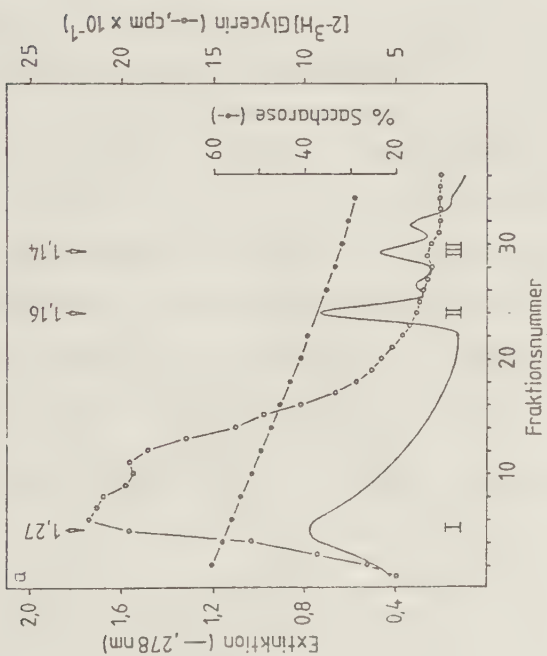
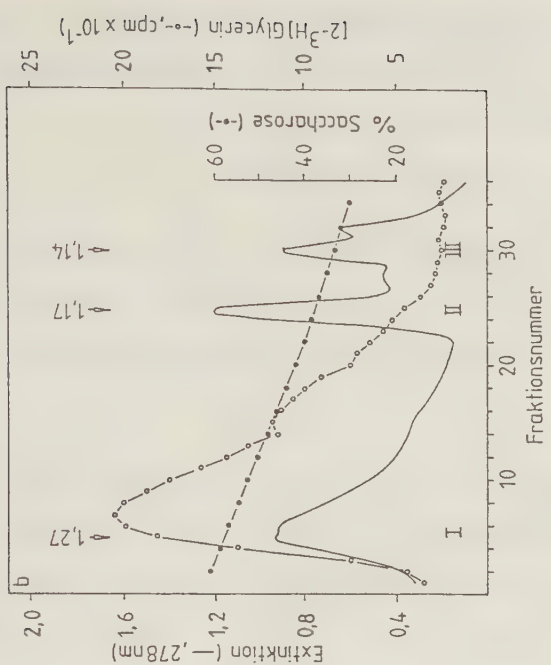
fraktionen Ib, Ic und Id bezüglich ihrer Schwimmdichte entsprechen.

#### 3.4.8 "Pulse-chase"-Markierung der Bakterien und Zellzerstörung durch Anwendung der MD-Methode

Durch dieses Experiment sollte erneut überprüft werden, ob es nach "pulse"-Markierung der Bakterien mit  $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$  im Verlaufe mehrerer Zellteilungen zu einer Durchmischung von radioaktiv markiertem Membranmaterial und Peak-II- und Peak-III-Material kommen kann.

Eine 1:100 Verdünnung einer Übernachtskultur von *E. coli* D509 wurde bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{580}$  von 0,24 inkubiert und 10 Sekunden lang mit  $40 \mu\text{Ci}/100 \text{ ml } [2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$  markiert, bevor die Aufnahme durch Zugabe eines Überschusses an "kaltem" Glycerin gestoppt wurde. Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert und in demselben Volumen an frischem,  $37^\circ\text{C}$  warmem und glycerinfreiem Mueller-Hinton-Medium suspendiert und weiter bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Bei optischen Dichten von 0,3, 0,5 und 1,5 und nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen isoliert und durch Anwendung der MD-Methode zerstört.

In Abb. 21a) - d) sind die entsprechenden, nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation erhaltenen Membrantrennungen



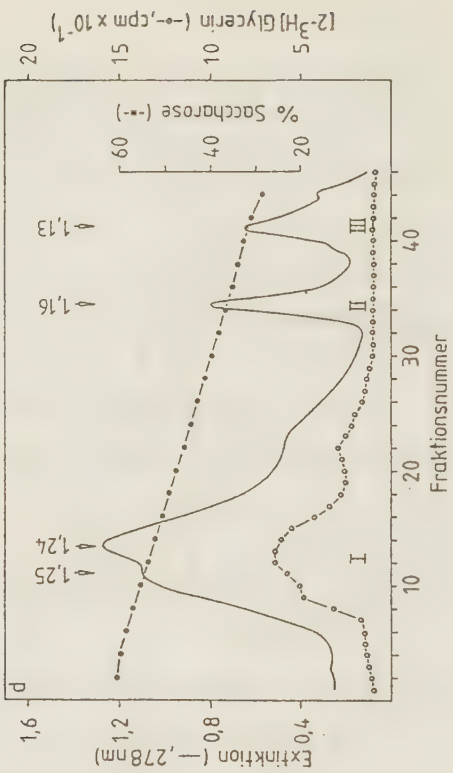
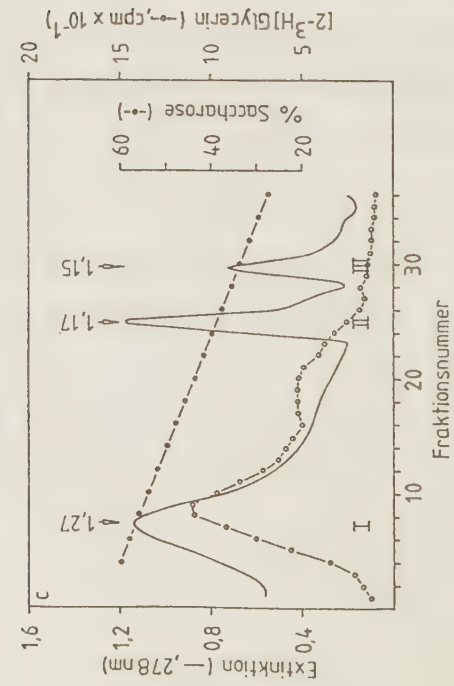


Abb. 21: Verteilung der radioaktiv markierten und unmarkierten Membranbruchstücke von *Escherichia coli* D509 im Saccharosedichtegradienten. Die Bakterien wurden bei einer  $\text{OD}_{580}$  von 0,24 mit  $[2-^3\text{H}]$  Glycerin "pulse"-markiert und bei optischen Dichten von 0,315 (a), 0,530 (b), 1,539 (c) und nach Übernachtwachstum (d) mittels MD-Methode zerstört.

dargestellt. Bei allen vier Proben besaß das radioaktiv markierte Membranmaterial eine Schwimmdichte, die mit derjenigen von Peak-I-Material übereinstimmt. Das Profil der Radioaktivität war mit demjenigen der allgemeinen Peak-I-Membranverteilung ( $OD_{280}$ ) weitgehend koinzident. Eine Durchmischung von radioaktiv markiertem Membranmaterial und Peak-II- und Peak-III-Material wurde, selbst nach Inkubation der Bakterien über Nacht, nicht festgestellt.

### 3.5 Dichtegradientenverteilungen der Membranbruchstücke [ $2\text{-}^3\text{H}$ ]- und [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ]Glycerin markierter, mit Glycerin als Kohlenstoffquelle gewachsener Bakterien

Aus den bisher beschriebenen Befunden geht hervor, daß die verwendeten E. coli-Stämme CM-Lipide, im Gegensatz zu OM-Lipiden, bei exogen angebotenenem Glycerin (in Mueller-Hinton-Bouillon) offenbar nicht durch direkte Acylierung dieses Glycerins synthetisieren, denn andernfalls hätte auch Peak-II- und Peak-III-Material radioaktiv markiert werden müssen. Eine denkbare Erklärung für dieses Ergebnis ist, daß [ $2\text{-}^3\text{H}$ ]Glycerin, das nach Aufnahme durch die Zellen ins Cytoplasma gelangt, dort nach der Phosphorylierung zum weitaus größten Teil unter Verlust der Markierung metabolisiert wird. Unter dieser Annahme sollten auch nach dem Wachstum der Zellen mit Glycerin als einziger Kohlenstoff-

quelle nur Domänen der OM radioaktiv markiert werden. Diese Überlegungen sollten durch folgende Experimente überprüft werden.

### 3.5.1 [2-<sup>3</sup>H]Glycerin-Markierung der Bakterien

Übernachtskulturen von E. coli WF96 und D509 wurden 1:50 in DO-Minimalmedium, das 3% Glycerin und 5  $\mu$ Ci [2-<sup>3</sup>H]Glycerin (11,5 Ci/mmol) pro 100 ml enthielt, verdünnt und bis zum Erreichen einer OD<sub>580</sub> von etwa 0,35 ( $4,3 \times 10^8$  Zellen/ml) unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach der OL-Methode zerstört und ihre Membranen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt (Abb. 22a und b).

Bei beiden Stämmen wurden die radioaktiv markierten Membranbruchstücke in einem Peak mit einer Schwimmdichte von 1,25 g/cm<sup>3</sup> (Ic) fokussiert. Bei E. coli D509 war Peak Ia-Material nicht, beim WF96 nur relativ schwach markiert. In den CM-Fraktionen (Peak II, III), von denen nur relativ wenig Material isoliert wurde, konnte keine mit diesen Membranen koinzidente Radioaktivitätsverteilung festgestellt werden.

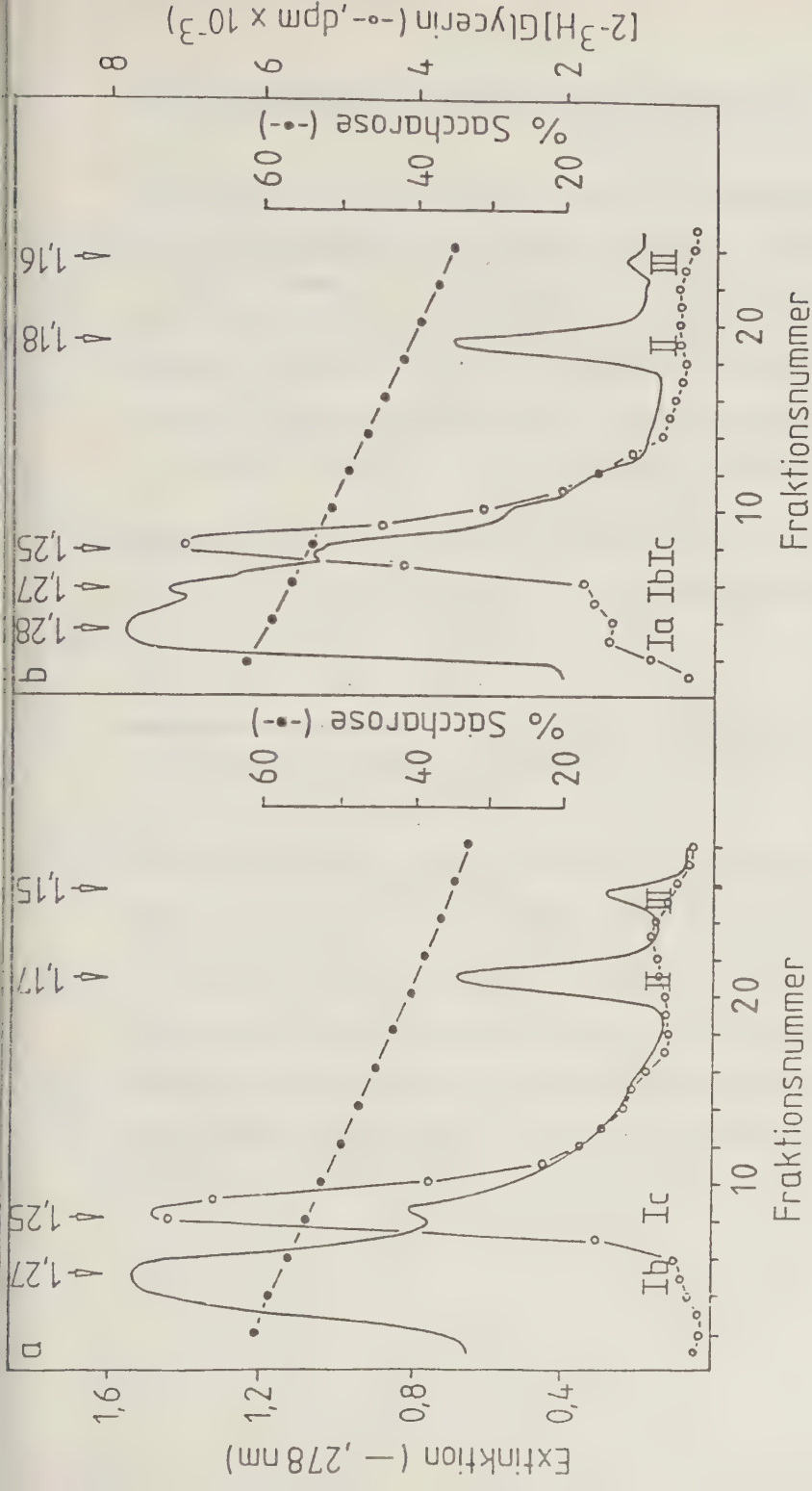


Abb. 22: Verteilung der radioaktiv markierten und unmarkierten Membranbruchstücke von *Escherichia coli* D509 (a) und *Escherichia coli* WF96 (b) im Saccharosedichtegradienten. Die Bakterien wurden kontinuierlich in Minimalmedium, das Glycerin als Kohlenstoffquelle enthält, mit  $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$  markiert und nach der OL-Methode zerstört.

### 3.5.2 [U-<sup>14</sup>C]Glycerin-Markierung der Bakterien

Eine Übernachtkultur von E. coli WF96 wurde 1:50 in DO-Medium, das 3% Glycerin enthielt, bis zum Erreichen einer OD<sub>580</sub> von 0,4 inkubiert. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert und in frischem DO-Medium, das 3% Glycerin und 16,7 µCi [U-<sup>14</sup>C]Glycerin (171 mCi/mmol) enthielt, suspendiert. Bei einer OD<sub>580</sub> von 0,5 wurden die Zellen abzentrifugiert und ihre Membranen nach der OL-Methode isoliert.

Wie Abb. 23 zeigt, werden auf diese Weise sämtliche Membranfraktionen markiert.

### 3.6. Untersuchung des radioaktiv markierten Materials auf methanol- und chloroformlösliche Anteile

Da [2-<sup>3</sup>H]Glycerin nicht nur in Lipide, sondern auch in andere membranassoziierte Verbindungen, wie z.B. MDO (membrane derived oligosaccharides) oder das Braun'sche Lipoprotein, eingebaut werden kann, sollte das radioaktiv markierte Material auf seine Methanol- bzw. Chloroformlöslichkeit untersucht werden. Dabei wurde vorausgesetzt, daß von den Verbindungen, die für den Einbau von [2-<sup>3</sup>H]Glycerin ohne Verlust der Markierung in Frage kommen, im wesentlichen nur Lipide chloroformlöslich sind.

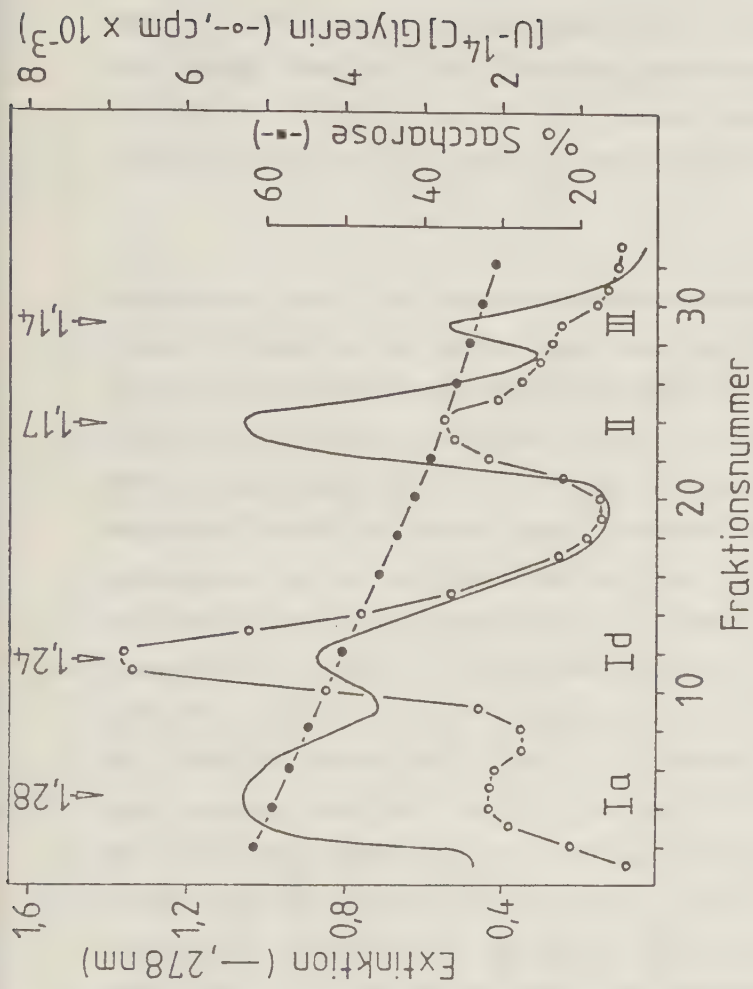


Abb. 23: Verteilung der radioaktiv markierten und unmarkierten Membranbruchstücke von *Escherichia coli* WF96 im Saccharosedichtegradienten. Die Bakterien wurden kontinuierlich in Minimalmedium, das Glycerin als Kohlenstoffquelle enthält, mit  $[U-^{14}C]$  Glycerin markiert und nach der OL-Methode zerstört.

E. coli D509 wurde wie unter 2.2.4 beschrieben kontinuierlich oder "pulse"- markiert.

Die kontinuierlich markierten Bakterien inkorporierten etwa 27% der angebotenen Radioaktivität, von den "pulse"-markierten Zellen wurden etwa 30% gebunden. Die Freisetzung von Radioaktivität betrug 30 Minuten nach dem "pulse" weniger als 7%.

Nach Chloroform/Methanol-Extraktion der durch osmotischen Schock der Zellen erhaltenen Lysate und der durch Ultrazentrifugation der Lysate erhaltenen Überstände, wurden die in den Chloroform- und Methanolphasen enthaltenen Radioaktivitätsmengen gemessen. Aus der Differenz dieser Werte wurden die mit den Membranen assoziierten Radioaktivitätsmengen berechnet (Tab. 10). Darüber hinaus wurden die prozentualen Anteile chloroform- und methanollöslichen radioaktiven Materials und die Summen der in den Chloroform- und Methanolphasen enthaltenen Radioaktivitätsmengen bestimmt. Bei Membranen von kontinuierlich markierten Bakterien waren 75% der Gesamtaktivität chloroformlöslich. Im Gegensatz dazu reichte die Inkubationszeit von 10 Sekunden nach Zugabe von [2-<sup>3</sup>H]Glycerin nur für den Einbau eines Teils der Markierung in vollständige Lipide aus, denn nur etwa 25% der membrangebundenen Radioaktivität erwiesen sich als chloroformlöslich. Ein großer Teil der unmittelbar nach der "pulse"-Markierung als methanollöslich identifizierten Moleküle

Tab. 10: Einbau der  $^3\text{H}$ -Markierung in methanol- und chloroformlösliches Material

| Markierung                     | Probe a)  | Gesamt              | Radioaktivität (dpm) |      |                        |
|--------------------------------|-----------|---------------------|----------------------|------|------------------------|
|                                |           |                     | Methanol-<br>löslich | % b) | Chloroform-<br>löslich |
| Kontinuierlich                 | Lysat     | $2,263 \times 10^7$ | $8,836 \times 10^6$  | 39   | $1,379 \times 10^7$    |
|                                | Überstand | $4,620 \times 10^6$ | $4,407 \times 10^6$  | 96   | $2,130 \times 10^5$    |
|                                | Membranen | $1,801 \times 10^7$ | $4,428 \times 10^6$  | 25   | $1,358 \times 10^7$    |
| 10 sek. Pulse<br>10 sek. Chase | Lysat     | $5,821 \times 10^6$ | $5,031 \times 10^6$  | 86   | $7,892 \times 10^5$    |
|                                | Überstand | $3,327 \times 10^6$ | $3,155 \times 10^6$  | 95   | $1,725 \times 10^5$    |
|                                | Membranen | $2,493 \times 10^6$ | $1,876 \times 10^6$  | 75   | $6,167 \times 10^5$    |
| 10 sek. Pulse<br>30 min. Chase | Lysat     | $5,416 \times 10^6$ | $4,035 \times 10^6$  | 75   | $1,380 \times 10^6$    |
|                                | Überstand | $4,196 \times 10^6$ | $3,897 \times 10^6$  | 93   | $2,982 \times 10^5$    |
|                                | Membranen | $1,220 \times 10^6$ | $1,380 \times 10^5$  | 22   | $1,082 \times 10^6$    |

a) Die Werte beziehen sich auf jeweils 200 ml Kultur von E. coli D509 deren  $\text{OD}_{580}$  etwa 0,5 betrug.

b) Prozent der Gesamtradioaktivität

konnte nach weiteren 30 Minuten Wachstum der Bakterien in Lipide eingebaut werden. Nach dieser Inkubationszeit waren etwa 89% der membrangebundenen Radioaktivität chloroformlöslich.

### 3.7        **Die Fettsäure-Substitution der in den Membranfraktionen enthaltenen Lipide**

Obgleich leichte Unterschiede vorhanden sein können, ist die Fettsäure-Zusammensetzung von isoliertem Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin und Cardiolipin sehr ähnlich (77). In der Regel wird Position 1 im Glycerin-3-Phosphat mit einer gesättigten und Position 2 mit einer ungesättigten Fettsäure verestert (28, 164). Dennoch besteht jede Hauptlipidspezies aus Lipidmolekülen, die sich in ihrer Fettsäure-Verteilung unterscheiden (27, 164). Das bedeutet, eine Analyse der Fettsäure-Verteilung unterschiedlicher Membranfraktionen läßt gleichzeitig Rückschlüsse auf die Verteilung unterschiedlich substituierter Lipidmoleküle zu. Diese Überlegungen bildeten die Grundlage für die Untersuchung der Fettsäurezusammensetzung von Peak-I-, Peak-II- und Peak-III-Lipiden bei *Escherichia coli* D509, nach Zerstörung der Bakterien durch Anwendung der MD- und der OL-Methode.

Das Ergebnis ist in Tab. 11 dargestellt. Bei den Membranen MD-zerstörter Zellen unterschied sich Peak I signifikant in der Fettsäure-Zusammensetzung von Peak II und III. Peak-I-Material enthielt 30 - 40% mehr Palmitinsäure, 37 - 39% weniger Cyclopropansäuren und 21 - 31% weniger Ölsäure als Peak-II- und Peak-III-Membranmaterial. Die CM-Peaks (II, III) wiesen eine fast gleiche Fettsäurezusammensetzung auf. Sehr inhomogen war dagegen das Bild bei der Fettsäureverteilung in den entsprechenden Membranfraktionen osmotisch lysierter Bakterien. Während sich die Zusammensetzung der korrespondierenden Peak-II-Fraktionen kaum unterschied, war die Fettsäure-Verteilung in den entsprechenden Peak-I- und Peak-III-Fraktionen stark abhängig von der zur Zellzerstörung angewendeten Methode. Darüber hinaus waren alle drei nach Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Hauptmembranfraktionen (I, II, III) von osmotisch lysierten Bakterien bezüglich ihrer Fettsäuren unterschiedlich zusammengesetzt.

Tab. 11: Prozentualer Anteil der Hauptfettsäuren in den durch Saccharose-dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten Membranfraktionen von E. coli D509 nach Zerstörung der Bakterien durch Anwendung der OL- bzw. MD-Methode

|    | Peak I           | Peak II    | Peak III   |
|----|------------------|------------|------------|
| MD | Palmitinsäure    | 47,9 ± 4,5 | 36,8 ± 6,0 |
|    | Palmitoleinsäure | 22,1 ± 0,3 | 21,6 ± 0,2 |
|    | Cyclopropansäure | 9,0 ± 0,3  | 14,8 ± 0,1 |
|    | Oleinsäure       | 21,0 ± 3,2 | 26,8 ± 5,8 |
| OL | Palmitinsäure    | 39,0 ± 1,0 | 34,3 ± 0,5 |
|    | Palmitoleinsäure | 20,8 ± 0,5 | 21,8 ± 1,6 |
|    | Cyclopropansäure | 12,5 ± 0,2 | 14,5 ± 0,6 |
|    | Oleinsäure       | 27,6 ± 0,7 | 29,4 ± 1,5 |
|    |                  |            | 48,2 ± 2,0 |
|    |                  |            | 11,0 ± 1,3 |
|    |                  |            | 17,2 ± 0,8 |
|    |                  |            | 23,7 ± 1,0 |

#### 4. Diskussion

Die Ergebnisse jeder Untersuchung zum Aufbau, zu den physikochemischen Eigenschaften und zur Biogenese der Zellhülle von gramnegativen Bakterien ist, sofern sie nicht an intakten Zellen durchgeführt wird, a priori geprägt durch die Methode, die zur Isolierung und Trennung ihrer Bestandteile angewendet wird. Diese sollte einer Heterogenität der zu isolierenden Strukturen gerecht werden und insbesondere die zu untersuchenden Eigenschaften so weit wie möglich uneinflusst lassen. Aus diesem Grunde wurde bei der vorliegenden Arbeit der Auswahl der zur Isolierung und Trennung von OM und CM angewendeten Methoden besonderes Gewicht zugemessen.

Die gegenwärtigen Vorstellungen zur Biogenese der OM wurden weitgehend geprägt durch die von Osborn et al. (123, 126, 127, 128) publizierten Ergebnisse, nach denen sowohl LPS als auch OM-Lipide zunächst in der CM synthetisiert und anschließend in die OM transportiert werden. Die von dieser Arbeitsgruppe zur Membranisolierung und -trennung angewendete Methode ist eine Modifikation einer zuerst von Miura und Mizushima (102) entwickelten Technik. Sie ist, obgleich es viele Ansätze zur Trennung der OM gramnegativer Bakterien gibt, das wohl am häufigsten benutzte Verfahren.

Eine der in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurde von Kroll et al. (78) veröffentlicht. Sie unterscheidet sich von der von Osborn (127) beschriebenen Technik und anderen insbesondere dadurch, daß während der Zerstörung der Bakterien und bei der Präparation der Membranen auf den Zusatz von EDTA verzichtet wurde. Dies erscheint besonders bedeutsam, weil von Leive (84) gezeigt werden konnte, daß *E. coli*-Zellen nach EDTA-Zusatz fast die Hälfte des LPS freisetzen und darüber hinaus gegenüber hydrophoben Verbindungen empfindlicher wurden (85). Entsprechendes wurde auch für *P. aeruginosa* beschrieben (51). Durch EDTA induzierte Veränderungen der Permeabilitätseigenschaften gramnegativer Bakterien wurden von Nikaido und Nakae (117) damit erklärt, daß die aus der äußeren Lamelle der OM freigesetzten LPS-Moleküle durch Phospholipidmoleküle entweder aus der inneren Lamelle der OM oder aus der Cytoplasmamembran ersetzt werden. EDTA-Behandlung von *Escherichia coli* bewirkt außerdem eine verstärkte Produktion von freien Fettsäuren, die vermutlich auf die Aktivierung einer endogenen Phospholipase zurückzuführen ist (57). Dadurch könnte die Hydrolyse von Phospholipiden eine Umorganisation der Membranen bewirken.

Die zweite in dieser Arbeit angewendete Methode der Zellzerstörung durch hochfrequentes (50 Hz) Schütteln einer Zellsuspension in Gegenwart kleiner (0,17 mm) Glasperlen wurde deshalb gewählt, weil durch sie, im Vergleich zur er-

sten Methode, auf vollkommen andere Art und Weise Membranbruchstücke hergestellt werden konnten, die nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation eine sehr ähnliche, gut vergleichbare Verteilung zeigten.

Beide angewendeten Methoden führten wiederum zu Befunden, die Gemeinsamkeiten mit den von Osborn veröffentlichten aufwiesen. So wurden von Osborn et al. (127) nach isopyknischer Saccharosedichtegradientenzentrifugation von Gesamtembrangemischen vier Banden bei Schwimmdichten von 1,22, 1,19, 1,16, und 1,14 g/cm<sup>3</sup> gemessen. Der Peak bei 1,22 g/cm<sup>3</sup> enthielt eine Anreicherung von OM-Material, derjenige mit einer Schwimmdichte von 1,19 g/cm<sup>3</sup> wurde als ein wahrscheinlich artifiziell entstandenes Gemisch aus OM und CM angesehen und die Peaks mit Schwimmdichten von 1,16 und 1,14 g/cm<sup>3</sup> wurden als CM identifiziert. Die von Osborn et al. (127) für die CM-Peaks ermittelten Schwimmdichten (1,16 g/cm<sup>3</sup>; 1,14 g/cm<sup>3</sup>) sind damit in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit festgestellten (1,166 g/cm<sup>3</sup>; 1,145 g/cm<sup>3</sup>) (Tab. 3). Die für die OM von Escherichia coli bestimmte Schwimmdichte von 1,24 - 1,28 g/cm<sup>3</sup> ist höher als die von Osborn et al. (127) für Salmonella typhimurium (1,22 g/cm<sup>3</sup>) ermittelte. Dieser Unterschied steht vermutlich in kausalem Zusammenhang mit dem Aufbau und der Zusammensetzung der OM von den hier verwendeten E. coli-Stämmen und dem von Osborn et al. (127) benutzten Stamm S. typhimurium, und nicht mit den Methoden der Zellzerstörung, denn

nach Anwendung der OL-Methode wurden auch für die OM von P. aeruginosa Schwimmdichten von etwa 1,21 und 1,24 g/cm<sup>3</sup> bestimmt, die sich damit stark von den für Escherichia coli ermittelten unterscheiden.

Eine gute Übereinstimmung zwischen den in dieser Arbeit dargestellten Befunden und den von Osborn et al. (127) für Salmonella typhimurium veröffentlichten Ergebnissen war darüber hinaus bei den Bestimmungen der Phospholipid/Protein-Verhältnisse der OM und CM festzustellen. So ermittelten Osborn et al. für die CM einen Wert von 0,53 - 0,61 und für die OM von 0,3. In der vorliegenden Arbeit wurde für die CM ein Verhältnis von 0,61 - 0,66 (Peak II) bzw. 0,30 - 0,33 (Peak III) und für die OM ein Wert von 0,31 - 0,36 festgestellt (Tab. 5b). Von Rottem et al. (149) wurde für den Anteil von Phospholipid am Membranmaterial bei der CM ein Wert von 38%, bei der OM von 18% bestimmt.

Im Gegensatz zu Osborn et al. (127), die keine gravierenden Unterschiede zwischen den beiden CM-Fraktionen feststellen konnten, wurde in dieser Arbeit eine asymmetrische Verteilung einzelner Proteine (Abb. 9, 10) und insbesondere aber auch der CM-Markerenzyme (Tab. 4) nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte eine unterschiedliche Vesikelbildung bei Peak-II- und Peak-III-Membranen sein, so daß im einen Fall "inside out" - im anderen "right-side out"-Vesikel entstehen, denn es ist bekannt,

daß Enzyme oft entweder auf der einen oder auf der anderen Seite der Lipid-Doppelschicht lokalisiert sind. So wurde z.B. gezeigt, daß Antikörper mit Spezifität für D-Laktat-Dehydrogenase ihrem Antigen in Lysozym-EDTA-Typ-Vesikeln nicht zugänglich sind (45, 163). Da viele Proteine der CM wahrscheinlich zu größeren Komplexen zusammengelagert und nicht vollkommen zufällig über die gesamte Membran verteilt sind, könnte der quantitativ unterschiedliche Proteingehalt von Peak-II- und Peak-III-Material auch die in vivo-Situation widerspiegeln. Quantitative Unterschiede wurden auch von De Leij und Witholt (34) zwischen den CM-Fraktionen unterschiedlicher Schwimmdichte nachgewiesen.

Bemerkenswert sind darüber hinaus die Unterschiede, die in der Fettsäure-Zusammensetzung zwischen Peak-II- und Peak-III-Membranmaterial von osmotisch lysierten Bakterien festgestellt wurden. Da Phospholipide in der CM eine hohe laterale Mobilität aufweisen, ist aus diesem Befund abzuleiten, daß Peak-II- oder Peak-III-Material ein Gemisch aus Membranbruchstücken ist, die aus Domänen stammen, welche in vivo topologisch getrennt vorliegen. Daß sowohl Peak-II- als auch Peak-III-Material durch OM-Membranbruchstücke kontaminiert ist, geht auch aus der Bestimmung des in Peak II und III enthaltenen LPS hervor (Tab. 5). Den höchsten Anteil an OM-Material enthält danach Peak III von osmotisch lysierten Bakterien.

Die effektivste Trennung von OM und CM ist nach Zerstörung der Bakterien durch MD zu erreichen. Das schonendere Verfahren, bei dem eine stärkere Differenzierung der Hauptmembranfraktionen in Subfraktionen möglich ist, stellt jedoch die OL-Methode dar. Dies wird nicht nur durch die - nach osmotischer Lyse der Zellen - in der Regel stärkere Auftrennung von Peak-I-Material in Subfraktionen deutlich, sondern insbesondere auch nach Markierung der Bakterien mit  $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$  und Bestimmung der Verteilung markierter und nicht markierter Membranbruchstücke nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Nach osmotischer Lyse der Zellen können die radioaktiv markierten Membranen, die nach MD als eine Bande (Peak I) isoliert werden, in zwei Fraktionen (Peak I, Peak S) aufgetrennt werden. Peak-S-Material besitzt dabei eine nur geringfügig höhere Schwimmdichte als Peak-II-Material. Andere Versuchsbedingungen könnten vielleicht sogar zu einer Durchmischung von Peak-II- und Peak-S-Material nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation der Membranen führen. Diese Möglichkeit wurde auch bei den von Osborn et al. durchgeführten Versuchen nicht ausgeschlossen.

Aus dem in "pulse-chase"-Experimenten ermittelten Befund, daß ein Teil der in Peak S enthaltenen Radioaktivität im Verlauf der Inkubationszeit in Peak-I-Membranen transportiert wird, kann geschlossen werden, daß Peak S einen Syntheseort zumindest eines Teils der in Peak I enthaltenen

radioaktiv markierten Moleküle darstellt. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß es sich bei den radioaktiv markierten Molekülen zu mehr als 75% um Phospholipide handelt.

Die "pulse-chase"-Experimente lassen auch Rückschlüsse auf die topologische Zuordnung von Peak-S-Material zu. In keinem der durchgeführten Versuche wurden die Lipide von Peak-II- und Peak-III-Material radioaktiv markiert. Selbst ein Übernachtwachstum in  $[2-^3\text{H}]$ Glycerin enthaltendem Medium und Rekultivierung der Bakterien in frischem, kein radioaktives Glycerin enthaltendem Medium führte zu keiner Markierung der CM-Fraktionen (Abb. 17). Dies bedeutet, daß unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ausschließlich OM- und Peak-S-Lipide mit  $[2-^3\text{H}]$ Glycerin markiert werden können, nicht jedoch CM-Lipide. Nach dem Fluid-Mosaik-Modell (165) sollten sich radioaktiv markierte Lipidmoleküle, die in den Lipid-Bilayer der CM eingebaut wurden, sehr schnell mit den nicht markierten Lipiden vermischen und somit eine homogene Verteilung der Radioaktivität über die gesamte CM bewirken. Dies wurde nicht beobachtet. Daraus ist zu schließen, daß die Peak-I- und Peak-S-Material entsprechenden Membranen in vivo derart von der CM getrennt, daß sie keine Lipide an die CM abgeben können. Dies impliziert, daß es wahrscheinlich keine "Lipidbrücken" zwischen der OM und CM gibt.

Hier stellt sich die Frage, wie die von Bayer (6) an Dünnschnitten plasmolysierter E. coli-Zellen beschriebenen Kon-

taktstellen zwischen der äußeren und inneren Membran beschaffen sind. Über die biochemische Zusammensetzung dieser sogenannten "adhesion sites" oder "Bayer's junctions" ist fast nichts bekannt, aber es gibt einige morphologische Untersuchungen, die einen Einblick in die funktionellen Eigenschaften dieser Strukturen erlauben. "Adhesion sites" dienen einigen Phagen als Adhäsionszonen und gleichzeitig als Verbindungen, durch die ihre Nukleinsäuren ins Zellinnere injiziert werden können. Es wurde bereits auf die Untersuchungen von Mühlradt et al. (107) hingewiesen, nach denen neu synthetisiertes LPS zunächst über den Kontaktstellen zwischen OM und CM auf der Zelloberfläche erscheint, ehe es sich gleichmäßig verteilt. Entsprechendes wurde von Smit und Nikaido (168) für den Einbau von Porinen in die OM von Salmonella typhimurium beschrieben. Von Bayer et al. (7) wurde an S. anatum festgestellt, daß "adhesion sites" eine Schwimmdichte besitzen, die intermediär zwischen derjenigen der OM und CM liegt. In diesen Experimenten wurde außerdem der von Mühlradt (107) publizierte Befund, daß neu synthetisiertes LPS zunächst über "Bayer's junctions" erscheint, mit einem prinzipiell anderen experimentiellen Ansatz bestätigt. Für Membranen intermediärer Schwimmdichte wurden weitere charakteristische Eigenschaften beschrieben. Sie können eine gegenüber den übrigen Membranen erhöhte spezifische Aktivität an Phospholipase A besitzen (7). Von Rodriguez-Tebar et al. (147) wurde außerdem festgestellt, daß Penicillin-Bindeprotein 3, welches an der

Biosynthese von Peptidoglykan beteiligt ist, ausschließlich in dieser Membranfraktion lokalisiert ist, nicht jedoch in der inneren und äußeren Membran. Es muß an dieser Stelle nachdrücklich angemerkt werden, daß die Befunde, die zur biochemischen Charakterisierung von Membranbruchstücken mittlerer Schwimmdichte veröffentlicht wurden, nicht kritiklos zu einem Gesamtbild zusammengefaßt werden können, da von den Autoren nicht nur Bakterien unterschiedlicher Spezies verwendet wurden, sondern auch verschiedene Methoden der Membranisolierung benutzt wurden. Eine intensive biochemische Untersuchung der Kontaktstellen zwischen OM und CM ist insbesondere deshalb mit großen Schwierigkeiten verbunden, weil diese Strukturen wahrscheinlich nur einen verschwindend kleinen Anteil vom Gesamtmembranmaterial ausmachen und nicht vollständig vom übrigen Membranmaterial abgetrennt werden können. Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse erscheint es denkbar, daß "adhesion sites" nicht nur an der Synthese von LPS und Peptidoglycan beteiligt sind, sondern auch Orte für die Synthese von OM-Lipiden darstellen. Dann muß jedoch für diese Verbindungsstellen zwischen der OM und CM eine Struktur vorausgesetzt werden, die eine Abgabe von Lipiden an die OM, nicht jedoch an die CM erlaubt.

Radioaktiv markierte Lipide, die in die äußere Membran gelangen, verteilen sich hier jedoch zunächst nicht zufällig über die gesamte Oberfläche, sondern sie sind in ihrer Mo-

bilität eingeschränkt. Die Radioaktivität erscheint insbesondere nach Zerstörung der Bakterien durch osmotischen Schock und Dichtegradientenzentrifugation der Membranen in distinkten Banden, die sich in ihrer Schwimmdichte unterscheiden und mit den beschriebenen Subfraktionen der OM ko-inzidiert sind. Die OM-Fraktionen Ia und Ib werden oft erst nach sehr langen Inkubationszeiten (Übernachtwachstum) der Bakterien markiert. Die sich bereits in den Schwimmdichten manifestierende Heterogenität der OM gramnegativer Bakterien wird durch diese Befunde weiter bestätigt. Mehrere Autoren haben die Vorstellung einer strukturellen Heterogenität der OM experimentiell bestätigt. So haben Begg und Donachie (9), aber auch Mug-Opstelten und Witholt (105) gezeigt, daß es distinkte Membranbezirke gibt, die aus biogenetisch "altem" und "jüngerem" OM-Material bestehen. Eine Asymmetrie ist auch in der lateralen Verteilung von OM-Proteinen und LPS festgestellt worden. So haben Untersuchungen von Begg und Donachie (10) ergeben, daß Omp A (eines der Haupt-OM-Proteine) hauptsächlich im Polkappenbereich von Escherichia coli lokalisiert ist. Von Leive (86) wurde entdeckt, daß LPS im OM-Peak von "Standardsedimentationsgradienten" nicht zufallsverteilt ist.

Eine Ursache für die Asymmetrie der Verteilung von OM-Komponenten liegt zweifellos in ihren Wechselwirkungen begründet. So gibt es starke Wechselwirkungen zwischen LPS und Phosphatidylethanolamin (42).

Von Takeuchi und Nikaido (173) konnte gezeigt werden, daß LPS-LPS-Wechselwirkungen zumindest in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen noch stärker sind als LPS-Phospholipid-Wechselwirkungen. Bei der Bestimmung von LPS-LPS-Wechselwirkungen ist die Abhängigkeit der Bindungen vom Vorhandensein von Kationen besonders zu beachten. LPS-Moleküle sind insbesondere im Glukosamin-Disaccharid-Teil mit negativ geladenen Gruppen substituiert. Eine Entfernung von zweiwertigen Kationen aus der OM, etwa durch EDTA-Behandlung, könnte zu einer gegenseitigen elektrostatischen Abstoßung von LPS-Molekülen und zur Umorganisation der Membran führen. Es ist bekannt, daß isoliertes LPS anorganische Ionen wie  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  und organische Ionen, wie z.B. die Polyamine Putrescin, Spermin und Spermidin, aber auch Ethanolamin enthält (25, 47). Das Vorhandensein von Kationen bestimmt darüber hinaus auch die Löslichkeit von isoliertem LPS (47).

Spezifische Wechselwirkungen wurden auch für LPS und Omp A beschrieben. Omp A kann in vivo als spezifischer Rezeptor für den Phagen Tu II fungieren (32). Diese Funktion wird jedoch nicht von isoliertem, Lipid- und LPS-freiem Omp-A-Protein ausgeübt (32, 161). Die höchste Aktivität als Phagenrezeptor gewinnt Omp A erst nach Zusatz von LPS, Phospholipiden und  $Mg^{2+}$  (161), obgleich auch eine Dispersion aus Omp-A-Protein und LPS als Phagenrezeptor aktiv ist. Entsprechende Befunde wurden auch für den Omp-A-spezi-

fischen Phagen K3 publiziert (177). Es ist weiterhin bekannt, daß Omp-A-Protein zur Stabilisierung von Zellaggregationen während der F-Plasmid-vermittelten Konjugation notwendig ist (96, 166). Auch diese Funktion kann nicht durch Zusatz von reinem Omp A-Protein, sondern nur von Omp-A-LPS-Komplexen beeinflußt werden (1, 160, 178). Daß die Interaktion von Omp A und LPS spezifisch ist, wurde von Beher et al. (11) gezeigt. LPS-Protein-Wechselwirkungen wurden jedoch nicht nur für Omp A, sondern auch für weitere Haupt-OM-Proteine beschrieben (60, 111, 196).

Auch OM-Proteine können starke Wechselwirkungen aufeinander ausüben. Es sei in diesem Zusammenhang insbesondere auf die Interaktion zwischen "freiem" und "gebundenem" Lipoprotein und den Matrixproteinen hingewiesen (33, 81).

Die zu den Wechselwirkungen der Haupt-OM-Bausteine beschriebenen Befunde legen die Schlußfolgerung nahe, daß die Fluidität der OM im Vergleich zur CM niedriger ist. Die Richtigkeit dieser Annahme wurde durch Untersuchungen zur lateralen Mobilität von Phospholipiden (24, 131, 148, 149) und LPS (86, 108) in der OM bestätigt. Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Ergebnisse zur ungleichmäßigen Verteilung von radioaktiv markierten Phospholipiden in den verschiedenen, mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation voneinander getrennten OM-Subfraktionen machen Un-

terschiede in der Fluidität der in ihnen enthaltenen Membranbruchstücke wahrscheinlich.

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente haben gezeigt, daß die CM-Lipide der hier benutzten E. coli-Stämme unter den dargestellten Versuchsbedingungen nicht mit  $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$  radioaktiv markiert werden konnten. Da gerade die CM den größten Anteil an membrangebundenen Lipiden enthält, ist dieser Befund zunächst erstaunlich und bedarf einer Erklärung.

Die verwendeten E. coli-Stämme sind beide in der Lage, mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dies bedeutet, sie können Glycerin in den Gesamtmetabolismus einschleusen und besitzen insbesondere keinen Defekt in der Bildung einer funktionellen Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, die den Reaktionsschritt vom Glycerin-3-Phosphat zum Dihydroxyacetonphosphat und damit die Eingangsreaktion zur Glycolyse katalysiert. Beim Wachstum der Bakterien in komplexen Nährmedien wie z.B. Mueller-Hinton-Bouillon ist deshalb nicht vorhersagbar, wieviel von dem exogen angebotenen Glycerin durch die Reaktion mit aktivierten Fettsäuren direkt acyliert bzw. über andere Stoffwechselwege umgesetzt wird. Die membrangebundene Radioaktivität kann sich nach Wachstum der Bakterien in Gegenwart von  $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$  nur in den Bausteinen der Zellhülle befinden, in die Glycerin ohne den Verlust des Tritium-Atoms eingebaut werden

kann. Es sind dies präferentiell Phospholipide und zu einem geringen Anteil Lipoproteine (insbesondere das Braun'sche Lipoprotein) und MDO (membrane derived oligosaccharides). Für die in Mueller-Hinton-Bouillon mit  $[2-^3\text{H}]$ Glycerin markierten Bakterien konnte gezeigt werden, daß mehr als 75% der Radioaktivität in Phospholipide eingebaut wurde. Da die CM-Lipide nicht markiert wurden, muß daraus gefolgert werden, daß das ins Cytoplasma gelangte Glycerin von den Zellen bis auf einen vielleicht nicht mehr in der CM nachweisbaren Anteil unter Verlust der Markierung metabolisiert wurde. Aus der nachgewiesenen Markierung der in der OM und in Peak-S-Membranmaterial lokalisierten Lipide geht hervor, daß diese Moleküle durch direkte Acylierung, und zwar nicht an der CM, synthetisiert wurden. Dies bedeutet, daß die terminalen Schritte der Lipidsynthese auch außerhalb der CM ablaufen können. Diese Befunde konnten durch Versuche zur Markierung der Bakterien in  $[2-^3\text{H}]$ Glycerin enthaltendem Minimalmedium mit Zusatz von Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle unterstützt werden. Auch unter diesen Bedingungen wurde ausschließlich die äußere, nicht jedoch die innere Membran markiert. Um einen quantitativen Einbau von  $[2-^3\text{H}]$ Glycerin in Phospholipide zu erreichen, erscheint es somit unumgänglich, mit Glycerin- bzw. Glycerin-3-Phosphat-auxotophen Bakterien zu arbeiten, die einen Defekt aufweisen, der eine Lipidsynthese nur über eine direkte Acylierung des angebotenen Glycerins bzw. Glycerin-3-Phosphates ermöglicht.

## 5. Zusammenfassung

Die Topologie der Synthese von Lipiden der äußeren Membran wurde an zwei E. coli-Stämmen untersucht. Die experimentielle Vorgehensweise bestand in der "pulse-chase"- oder kontinuierlichen Markierung der Bakterien mit  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Glycerin}$ , der Zerstörung der Zellen und der Charakterisierung der so erhaltenen Membranbruchstücke nach deren Auftrennung mittels isopyknischer Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Es konnte gezeigt werden, daß eine effiziente Zerstörung von plasmolysierten Bakterien durch osmotischen Schock auch unter Verzicht auf den Zusatz von EDTA, dessen membranverändernde Eigenschaften bekannt sind, möglich ist.

2. Zwei verschiedene Methoden der Zellzerstörung - osmotischer Schock und hochfrequentes Schütteln der Bakterien in Gegenwart kleiner Glasperlen (MD) - führten zur Entstehung von Membranbruchstücken, die nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation sehr ähnliche Verteilungen aufwiesen. Bei beiden Methoden war eine Trennung der Membrangemische in OM- und CM-Fractionen möglich, wobei die Auftrennung nach osmotischer Lyse der Bakterien eine stärkere Differenzierung der OM in Subfraktionen zuließ und diejenige

nach MD eine effizientere Trennung der OM und CM ermöglichte.

3. Nach der Markierung der Bakterien mit  $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$  in Mueller-Hinton-Bouillon, Zerstörung der Zellen mittels osmotischen Schock und Saccharosedichtegradientenzentrifugation der Membranen wurden die radioaktiv markierten Bruchstücke in zwei Hauptbanden fokussiert, von denen die eine Koinzidenz mit Subfraktionen der OM aufwies und die andere (Peak S) eine Schwimmdichte besaß, die leicht, aber signifikant höher lag als diejenige des dichteren CM-Peaks, und die damit zwischen derjenigen der OM- und CM-Fractionen lag. Mit Hilfe von "pulse-chase"-Experimenten konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß ein Teil der in Peak-S-Membranmaterial enthaltenen radioaktiv markierten Lipide im Verlauf der Inkubationszeit nach dem "pulse" in die OM gelangt. Hieraus wurde gefolgert, daß in den dem Peak-S-Material entsprechenden Membrandomänen OM-Lipide synthetisiert werden können.

4. Nach Markierung der Bakterien mit  $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$ , Zerstörung der Zellen mittels MD und Saccharosedichtegradientenzentrifugation der Membranen wurden die radioaktiv markierten Membranbruchstücke in einer Hauptbande fokussiert, die Koinzidenz mit der OM aufwies. Dieser Befund legt die Schlußfolgerung nahe, daß Peak-S-Membranmaterial

in vivo eng mit der OM verbunden ist oder eine Subfraktion der OM darstellt.

5. In keinem der durchgeführten Experimente konnten die Lipide der CM-Fractionen durch Inkubation der Bakterien in Gegenwart von  $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$  radioaktiv markiert werden. Dieser Befund gilt insbesondere auch für Bakterien, die in Minimalmedium mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle angezüchtet wurden.

6. Es konnte selbst nach Wachstum der Bakterien über Nacht in Gegenwart von  $[2-^3\text{H}]\text{Glycerin}$  oder nach Markierung der Zellen über Nacht und Rekultivierung in frischem Medium keine Abgabe von OM- bzw. Peak-S-Membranmaterial assoziieren, radioaktiven Lipiden an die CM festgestellt werden.

Die dargestellten Befunde implizieren folgende Schlußfolgerungen:

Die Phospholipide der OM von Escherichia coli können in abgegrenzten Membrandomänen synthetisiert werden. Die hier lokalisierten Lipide werden nicht an die CM sondern ausschließlich an die OM abgegeben. Das bedeutet, daß diese Membrandomänen in vivo wahrscheinlich eng mit der OM verbunden sind oder sogar einen Teil der OM darstellen und daß von der OM keine Lipide in die CM gelangen. Dieser Befund macht das Vorhandensein von "Lipidbrücken" zwischen der CM und der OM sehr unwahrscheinlich. Die zuerst von Bayer (6)

beschriebenen Kontaktstellen zwischen der OM und der CM können deshalb keine typische Membranstruktur besitzen und dienen nicht, wie dies unter anderem bisher vermutet wurde, zum Transport von Lipiden zwischen der CM und der OM. Die allgemeine Vorstellung, daß die Lipide der OM von gramnegativen Bakterien in der CM synthetisiert und von hier zur OM transportiert werden, erscheint vor dem Hintergrund der dargestellten Befunde als unwahrscheinlich.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Achtman, M., S. Schwuchow, R. Helmuth, G. Morelli und P.A. Manning (1978)  
Cell-cell interaction in conjugating Escherichia coli: con<sup>-</sup> mutants and stabilization of mating aggregates.  
Mol. Gen. Genet. 164, 171 - 183
2. Adler, J. (1975)  
Chemotaxis in bacteria.  
Annu. Rev. Biochem. 44, 341 - 356
3. Asselineau, C., H. Montrozier und J.C. Primé (1969)  
Présence d'acides polyinsaturés dans une bactérie: isolement, à partir des lipides de Mycobacterium phlei, d'acide hexatriacontapentaène-4,8,12,16,20 oïque et d'acides analogues.  
Eur. J. Biochem. 10, 580 - 584
4. Baker, R.F. und D.C. Pease (1949)  
Sectioning of the bacterial cell for the electron microscope.  
Nature (London) 163, 282
5. Bayer, M. und H. Thurow (1977)  
Polysaccharide capsule of Escherichia coli: microscope study of its size, structure, and sites of sythesis.  
J. Bacteriol. 130, 911 - 936
6. Bayer, M.E. (1979)  
The fusion sites between outer membrane and cytoplasmic membrane of bacteria: their role in membrane assembly and virus infection.  
In: Bacterial outer membranes, 167 - 202  
Herausgeber: M. Inouye, John Wiley & Sons, Inc., New York
7. Bayer, M.H., G.P. Costello und M.E. Bayer (1982)  
Isolation and partial characterization of membrane vesicles carrying markers of membrane adhesion sites.  
J. Bacteriol. 149, 758 - 769

8. Begg, K.J. und W.D. Donachie (1973)  
Topography of outer membrane growth in  
Escherichia coli.  
Nature (London) N. Biol. 245, 38 - 39
9. Begg, K.J. und W.D. Donachie (1977)  
Growth of the Escherichia coli cell surface.  
J. Bacteriol. 129, 1524 - 1536
10. Begg, K.J. und W.D. Donachie (1984)  
Concentration of a major outer membrane protein  
at the cell poles in E. coli.  
J. Gen. Microbiol. 130, 2239 - 2246
11. Beher, M., A. Pugsley und C. Schnaitman (1980)  
Correlation between the expression of an  
Escherichia coli cell surface protein and the  
ability of the protein to bind  
lipopolysaccharide.  
J. Bacteriol. 143, 403 - 410
12. Bell, R.M. (1974)  
Mutants of Escherichia coli defective in membrane  
phospholipid synthesis: macromolecular synthesis  
in an sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase  $K_m$   
mutant.  
J. Bacteriol. 117, 1065 - 1076
13. Bell, R.M., R.D. Mavis, M.J. Osborn und P.R. Vagelos  
(1971)  
Enzymes of phospholipid metabolism: localization  
in the cytoplasmic and outer membrane of the cell  
envelope of Escherichia coli and Salmonella  
typhimurium.  
Biochim. Biophys. Acta 249, 628 - 635
14. Benz, R. (1985)  
Porin from bacterial and mitochondrial outer  
membranes.  
Crit. Rev. Biochem. 19, 145 - 190

15.     Blobel, G. und B. Dobberstein (1975)  
        Transfer of proteins across membranes. I.  
        Presence of proteolytically processed and  
        nonprocessed nascent immunoglobulin light chains  
        on membrane-bound ribosomes of murine myeloma.  
        J. Cell. Biol. 67, 835 - 851
  
16.     Bloch, K. und D. Vance (1977)  
        Control mechanism in the sythesis of saturated  
        fatty acids.  
        Annu. Rev. Biochem. 46, 263 - 298
  
17.     Braun, V. (1975)  
        Covalent lipoprotein from the outer membrane of  
        Escherichia coli.  
        Biochim. Biophys. Acta 415, 335 - 377
  
18.     Braun, V. und K. Rehn (1969)  
        Chemical characterisation, spatial distrubtion,  
        and function of a lipoprotein (murein-  
        lipoprotein) of the E. coli cell wall. The  
        specific effect of trypsin on the membrane  
        structure.  
        Eur. J. Biochem. 10, 426 - 438
  
19.     Bray, D. und P.W. Robbins (1967)  
        The direction of chain growth in Salmonella  
        anatum O-antigen biosynthesis.  
        Biochem. biophys. Res. Commun. 28, 334 - 339
  
20.     Burdett, I.D.J. und R.G.E. Murray (1974)  
        Electron microscope study of septum formation in  
        Escherichia coli strains B and B/r during  
        synchronous growth.  
        J. Bacteriol. 119, 1039 - 1056
  
21.     Chang, Y.Y. und E.P. Kennedy (1967)  
        Biosynthesis of phosphatidyl glycerophosphate in  
        Escherichia coli.  
        J. Lipid Res. 8, 447 - 455
  
22.     Chang, Y.Y. und E.P. Kennedy (1967)  
        Phosphatidyl glycerophosphate phosphatase.  
        J. Lipid Res. 8, 456 - 462

23. Chapman, G.B. und J. Hillier (1953)  
Electron microscopy of ultra-thin sections of  
bacteria. I. Cellular division in Bacillus cereus.  
J. Bacteriol. 66, 362 - 373
24. Cheng, S., J.K. Thomas und C.F. Kulpa (1974)  
Dynamics of pyrene fluorescence in Escherichia coli membrane vesicles.  
Biochemistry 13, 1135 - 1139
25. Coughlin, R.T., S. Tonsager und E.J. McGroarty  
(1983)  
Quantitation of metal cations bound to membranes  
and extracted lipopolysaccharide of Escherichia coli.  
Biochemistry 22, 2002 - 2007
26. Cronan, J.E. (1975)  
Thermal regulation of the membrane lipid  
composition of Escherichia coli. Evidence for the  
direct control of fatty acid synthesis.  
J. Biol. Chem. 250, 7074 - 7077
27. Cronan, J.E. und E.P. Gelmann (1975)  
Physical properties of membrane lipids:  
biological relevants and regulation.  
Bacteriol. Rev 39, 232 - 256
28. Cronan, J.E. und P.R. Vagelos (1972)  
Metabolism and function of the membrane  
phospholipids of Escherichia coli.  
Biochim. Biophys. Acta 265, 25 - 60
29. Cronan, J.E. und R.M. Bell (1974)  
Mutants of Escherichia coli defective in membrane  
phospholipid synthesis: mapping of the structural  
gene for L-glycerol 3-phosphat dehydrogenase.  
J. Bacteriol. 118, 598 - 605
30. Cynkin, M.A. und M.J. Osborn (1968)  
Enzymatic transfer of O-antigen to  
lipopolysaccharide.  
Fedn. Proc. Am. Socs. exp. Biol. 27, 293

31. Dankert, M., A. Wright, W.S. Kelley und P.W. Robbins (1966)  
Isolation, purification, and properties of the lipid-linked intermediates of O-antigen biosynthesis.  
Archs. Biochem. Biophys. 116, 425 - 435
32. Datta, D.B., B. Arden und U. Henning (1977)  
Major proteins of the Escherichia coli outer envelope membrane as bacteriophage receptors.  
J. Bacteriol. 131, 821 - 829
33. De Martini, M. und M. Inouye (1978)  
Interaction between two major outer membrane proteins of Escherichia coli: the matrix protein and the lipoprotein.  
J. Bacteriol. 133, 329 - 335
34. DeLeij, L. und B. Witholt (1977)  
Structural heterogeneity of the cytoplasmic and outer membrane of Escherichia coli.  
Biochim. Biophys. Acta 471, 92 - 104
35. DiRienzo, J.M., K. Nakamura und M. Inouye (1978)  
The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions.  
Annu. Rev. Biochem. 47, 481 - 532
36. Donaldson, D.M., R.R. Roberts, H.S. Larsen und J.C. Tew (1974)  
Interrelationship between serum beta-lysin, lysozym, and the antibody-complement system in killing Escherichia coli.  
Infect. Immun. 10, 657 - 666
37. Dowhan, W., W.T. Wickner und E.P. Kennedy (1974)  
Purification and properties of phosphatidylserine decarboxylase from Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 249, 3079 - 3084
38. Endermann, R., C. Krämer und U. Henning (1978)  
Major outer membrane proteins of Escherichia coli K-12. Evidents for protein II\* being a trans-membrane protein.  
FEBS Lett. 86, 21 - 24

39. Filip, C., G. Fletcher, J.L. Wulff und C.F. Earhart (1973)  
Solubilization of cytoplasmic membrane of Escherichia coli by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate.  
J. Bacteriol. 115, 717 - 722
40. Folch, J., M. Less und G.H. Sloave-Stanley (1957)  
A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues.  
J. Biol. Chem. 226, 497 - 505
41. Fox, C.F., J.H. Law, N. Tsukagoshi und G. Wilson (1970)  
A density label for membranes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 598 - 605
42. Fried, V.A. und L.I. Rothfield (1978)  
Interactions between lipopolysaccharide and phosphatidylethanolamine in molecular monolayers.  
Biochim. Biophys. Acta 514, 69 - 82
43. Fukasawa, T., K. Jokura und K. Kurahashi (1962)  
A new enzymatic defect of galactose metabolism in Escherichia coli K-12 mutants.  
Biochem. biophys. Res. Comm. 7, 121 - 125
44. Funahara, Y. und H. Nikaido (1980)  
Asymmetric localisation of lipopolysaccharides on the outer membrane of Salmonella typhimurium.  
J. Bacteriol. 141, 1463 - 1465
45. Futai, M. (1974)  
Orientation of membrane vesicles from Escherichia coli prepared by different procedures.  
J. Memb. Biol. 15, 15 - 18
46. Gaffney, B.J. und S.C. Chen (1977)  
In: Methods in membrane biology 2, 291 - 358  
Herausgeber: E.D. Korn  
Plenum Press, New York und London

47. Galanos, C. und O. Lüderitz (1975)  
Electrodialysis of lipopolysaccharides and their  
conversion to uniform salt forms.  
Eur. J. Biochem. 54, 603 - 610
48. Galanos, C., O. Lüderitz, E.T. Rietschel und O.  
Westphal (1977)  
Newer aspects of the chemistry and biology of  
bacterial lipopolysaccharides, with special  
reference to their lipid A component.  
International Review of Biochemistry.  
Biochemistry of lipids II 14, 242 - 335
49. Gmeiner, J. und H.H. Martin (1976)  
Phospholipid and lipopolysaccharide in Proteus  
mirabilis and its stable protoplast L-form.  
Eur. J. Biochem. 67, 487 - 494
50. Gmeiner, J. und S. Schlecht (1979)  
Molecular organization of the outer membrane of  
Salmonella typhimurium.  
Eur. J. Biochem. 93, 609 - 620
51. Gray, G.W. und S.G. Wilkinson (1965)  
The action of ethylenediaminetetraacetic acid on  
Pseudomonas aeruginosa.  
J. Appl. Bacteriol. 28, 153 - 164
52. Halegoua, S. und M. Inouye (1979)  
Translocation and assembly of outer membrane  
proteins of Escherichia coli. Selective  
accumulation of precursors and novel assembly  
intermediates caused by phenethyl alcohol.  
J. Molec. Biol. 130, 39 - 61
53. Halegoua, S., J. Sekizawa und M. Inouye (1977)  
A new form of structural lipoprotein of outer  
membrane of Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 252, 2324 - 2330
54. Hancock, R.E.W. (1987)  
Role of porins in outer membrane permeability.  
J. Bacteriol. 169, 929 - 933
55. Hancock, R.E.W. und A.M. Carey (1979)  
Outer membrane of Pseudomonas aeruginosa: Heat  
and 2-mercapoethanol-modifiable proteins.  
J. Bacteriol. 140, 902 - 910

56. Hantke, K. (1976)  
Phage T 6-colicin K receptor and nucleoside transport in Escherichia coli.  
FEBS Lett. 70, 109 - 112
57. Hardaway, K.L. und C.S. Buller (1979)  
Effect of ethylenediaminetetraacetate on phospholipids and outer membrane function in Escherichia coli.  
J. Bacteriol. 137, 62 - 68
58. Hazelbauer, G.L. (1975)  
Role of receptor for bacteriophage lambda in the functioning of the maltose chemoreceptor of Escherichia coli.  
J. Bacteriol. 124, 119 - 126
59. Heath, E.C., R.M. Mayer, R.D. Edstrom und C.A. Beaudreau (1966)  
Structure and biosynthesis of the cell-wall lipopolysaccharide of Escherichia coli.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 133, 315 - 333
60. Henning, U. und K. Jann (1979)  
Two-component nature of bacteriophage T4 receptor activity in Escherichia coli K12.  
J. Bacteriol. 137, 664 - 666
61. Henning, U.L. (1975)  
Determination of the cell shape in bacteria.  
Annu. Rev. Microbiol. 29, 45 - 60
62. Hirota, Y., H. Suzuki, Y. Nishimura und S. Yasuda (1977)  
On the process of cellular division in Escherichia coli: a mutant of E. coli lacking a murein-lipoprotein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1417 - 1420
63. Hirschberg, C.B. und E.P. Kennedy (1972)  
Mechanism of enzymatic sythesis of cardiolipin in Escherichia coli.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 648 - 651

64. Hollifield, W.G. und J.B. Nielsands (1978)  
Ferric enterobactin transport system in Escherichia coli K-12. Extraction, assay, and specificity of the outer membrane receptor.  
Biochemistry 17, 1922 - 1928
  
65. Holroyd, C.D. und C. Bradbeer (1984)  
Cobalamine transport in Escherichia coli.  
In: Microbiology-1984, 21 - 23  
Herausgeber: L. Leive und D. Schlessinger  
American Society for Microbiology, Washington, D.C.
  
66. Ichihara, S., M. Hussain und S. Mizushima (1981)  
Characterization of new membrane lipoprotein and their precursors of Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 256, 3125 - 3129
  
67. Inouye, S., S. Wang, J. Sekizawa, S. Halegoua und M. Inouye (1977)  
Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the Escherichia coli outer membrane.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1004 - 1008
  
68. Ishidate, K., E.S. Creeger, J. Zrike, S. Dep, B. Glauner, T.J. MacAlister und L.I. Rothfield (1986)  
Isolation of differentiated membrane domains from Escherichia coli and Salmonella typhimurium, including a fraction containing attachment sites between the inner and outer membranes and the murein skeleton of the cell envelope.  
J. Biol. Chem. 261, 428 - 443
  
69. Ishinaga, M. und M. Kito (1974)  
Participation of soluble phosphatidylserine synthetase in phosphatidylethanolamine biosynthesis in Escherichia coli membrane.  
Eur. J. Biochem. 42, 483 - 487
  
70. Kamio, Y. und H. Nikaido (1977)  
Outer membrane of Salmonella typhimurium. Identification of proteins exposed on cell surface.  
Biochim. Biophys. Acta 464, 589 - 601

71. Kanfer, J. und E.P. Kennedy (1963)  
Metabolism and function of bacterial lipids. I.  
Metabolism of phospholipids in Escherichia coli  
B.  
J. Biol. Chem. 238, 2919 - 2922
  
72. Kanfer, J. und E.P. Kennedy (1964)  
Metabolism and function of bacterial lipids. II.  
Biosynthesis of phospholipids in Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 239, 1720 - 1726
  
73. Kanfer, J. und E.P. Kennedy (1964)  
Metabolism and function of bacterial lipids. II.  
Biosynthesis of phospholipids in Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 239, 1720 - 1726
  
74. Karkhanis, Y.D., J.Y. Zeltner, J.J. Jackson und D.J. Carlo (1978)  
A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria.  
Anal. Biochem. 85, 595 - 601
  
75. Kennedy, E.P., M.K. Rumley, H. Schulman und L.M.G. van Golde (1976)  
Identification of sn-glycero-1-phosphate and phosphoethanolamine residues linked to the membrane-derived oligosaccharides of Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 251, 4208 - 4213
  
76. Kent, J.L. und M.J. Osborn (1968)  
Haptenic O-antigene as a polymeric intermediate of in vivo sythesis of lipopolysaccharide by Salmonella typhimurium.  
Biochemistry 7, 4419 - 4422

77. Kito, M., S. Aibara, M. Kato und T. Hata (1972)  
Differences in fatty acid composition among  
phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol  
and cardiolipin of Escherichia coli.  
Biochim. Biophys. Acta 260, 475 - 478
  
78. Kroll, H.P., S. Bhakdi und P.W. Taylor (1983)  
Membrane changes induced by exposure of  
Escherichia coli to human serum.  
Infect. Immun. 42, 1055 - 1066
  
79. Leal, J. und H. Marcovich (1975)  
Electron microscopic observations of the tsx<sup>S</sup>  
gene expression in Escherichia coli K12F<sup>-</sup> cells  
after conjugation with Hfr bacteria.  
Mol. Gen. Genet. 139, 203 - 212
  
80. Lee, A.G., N.J.M. Birdsall und J.C. Metcalf (1974)  
In: Methods in membrane biology 2, 1 -56  
Herausgeber: E.D. Korn  
Plenum Press, New York und London
  
81. Lee, N., C. Scandella und M. Inouye (1978)  
Spin labeling of a cysteine residue of the  
Escherichia coli outer membrane lipoprotein in  
its membrane environment.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 127 - 130
  
82. Lehmann, V. (1977)  
Isolation, purification and properties of an  
intermediate in 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid-  
lipid A biosynthesis.  
Eur. J. Biochem. 75, 257 - 266
  
83. Lehmann, V., J. Redmond, A. Egan und I. Minner  
(1978)  
The acceptor for polar head groups of the lipid A  
component of Salmonella lipopolysaccharides.  
Eur. J. Biochem. 86, 487 - 496
  
84. Leive, L. (1965)  
Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment  
of E. coli.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 290 - 296

85. Leive, L. (1974)  
The barrier function of the gram-negative envelope.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 109 - 127
  
86. Leive, L. (1977)  
Domains involving nonrandom distribution of lipopolysaccharide in the outer membrane of Escherichia coli.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5065 - 5068
  
87. Lenard, J. und J.E. Rothman (1976)  
Transbilayer distribution and movement of cholesterol and phospholipid in the membrane of influenza virus.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 391 - 395
  
88. Leying, H., S. Suerbaum, H.P. Kroll, H. Karch und W. Opferkuch (1986)  
Influence of  $\beta$ -lactam antibiotics and ciprofloxacin on composition and immunogenicity of Escherichia coli outer membrane.  
Antimicrob. Agents Chemother. 30, 475 - 480
  
89. Lin, E.C.C. (1976)  
Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria.  
Annu. Rev. Microbiol. 30, 535 - 578
  
90. Liu, J.J.C., H. Kanazawa, J. Ozols und H.C. Wu (1978)  
An Escherichia coli mutant with an amino acid sequence alteration within the signal sequence of outer membrane prolipoprotein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4891 - 4895
  
91. Lowry, O.W., N.R. Roberts, K.Y. Leiner, M.L. Wu und A.L. Farr (1954)  
The quantitative histochemistry of brain. I. Chemical methods.  
J. Biol. Chem. 207, 1 - 17

92.     Lugtenberg, B. und L. van Alphen (1983)  
          Moleculare architecture and functioning of the  
          outer membrane of Escherichia coli.  
          Biochim. Biophys. Acta 737, 51 - 115
  
93.     Lugtenberg, B., J. Meijers, R. Peters, P. van der  
          Hoek und L. van Alphen (1975)  
          Electrophoretic resolution of the major outer  
          membrane protein of Escherichia coli K12 into  
          four bands.  
          FEBS Lett. 58, 254 - 258
  
94.     Macfarlane, M.G. (1961)  
          Composition of lipid from protoplast membranes  
          and whole cells of Micrococcus lysodeikticus.  
          Biochem. J. 79, 4 - 5
  
95.     Mäkelä, P.H., D.J. Bradley, H. Brandis, M.M. Frank,  
          H. Hahn, W. Henkel, K. Jann, S.A. Marse, J.B.  
          Robbins, L. Rosenstreich, H. Smith, K. Timmis, A.  
          Tomasz, M.J. Turner und D.C. Wiley (1980)  
          Evasion of host defences group report.  
          In: The molecular basis of microbial pathogenity,  
          174 - 197  
          Herausgeber: H. Smith, J.J. Skehel und M.J.  
          Turner  
          Verlag Chemie GmbH, Weinheim
  
96.     Manning, P.A. und M. Achtman (1979)  
          Cell-to-cell interactions in conjugating  
          Escherichia coli: the involvement of the cell  
          envelope.  
          In: Bacterial outer membranes, 409 - 447  
          Herausgeber: M. Inouye, John Wiley and sons,  
          Inc., New York
  
97.     Markwell, M.A.K., S.M. Haar, L.L. Bieber und W.E.  
          Tolbert (1978)  
          A modification of the Lowry procedure to simplify  
          protein determinations in membrane and  
          lipoprotein samples.  
          Anal. Biochem. 87, 206 - 210

98. Marr, A.G. und J.L. Ingraham (1962)  
Effect of temperature on the composition of fatty acids in Escherichia coli.  
J. Bacteriol. 84, 1260 - 1267
  
99. Meyer, D.I. (1982)  
The signal hypothesis - a working model.  
Trends Biochem. Sci. 7, 320 - 321
  
100. Meyer, D.I., E. Krause und B. Dobberstein (1982)  
Secretory protein translocation across the membranes - the role of the docking protein.  
Nature London 297, 647 - 650
  
101. Milstein, C., .G. Brownlee, T.M. Harrison und M.B. Matthews (1972)  
A possible precursor of immunoglobulin light chains.  
Nature London 239, 117 - 120
  
102. Miura, T. und S. Mizushima (1968)  
Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membrane of E. coli K 12.  
Biochim. Biophys. Acta 150, 159 - 161
  
103. Miura, T. und S. Mizushima (1969)  
Seperation and properties of outer and cytoplasmic membranes in Escherichia coli.  
Biochim. Biophys. Acta 193, 268 - 276
  
104. Mizuno, T., M.Y. Chou und M. Inouye (1983)  
A comparative study on the genes for three porins of the Escherichia coli outer membrane: DNA sequence of the osmoregulated ompC gene.  
J. Biol. Chem. 258, 6932 - 6940
  
105. Mug-Opstelten, D. und R. Withold (1978)  
Preferential release of new outer membrane fragments by exponentially growing Escherichia coli.  
Biochim. Biophys. Acta 508, 287 - 295

106. Mühlradt, P.F. und J.R. Golecki (1975)  
Asymmetrical distribution and artificial  
reorientation of lipopolysaccharide in the outer  
membrane bilayer of Salmonella typhimurium.  
Eur. J. Biochem. 51, 343 - 352
  
107. Mühlradt, P.F., J. Menzel, J.R. Golecki und V. Speth  
(1973)  
Outer membrane of Salmonella. Site of export of  
newly synthesized lipopolysaccharide on the  
bacterial surface.  
Eur. J. Biochem. 35, 471 - 481
  
108. Mühlradt, P.F., J. Menzel, J.R. Golecki und V. Speth  
(1974)  
Lateral mobility and surface density of  
lipopolysaccharides in the outer membrane of  
Salmonella typhimurium.  
Eur. J. Biochem. 43, 533 - 539
  
109. Munford, C.A. und M.J. Osborn (1983)  
An intermediate step in translocation of  
lipopolysaccharide to the outer membrane of  
Salmonella typhimurium.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1159 - 1163
  
110. Munsen, R.S., N.S. Rasmussen und M.J. Osborn (1978)  
Biosynthesis of lipid A. Enzymatic incorporation  
of 3-deoxy-D-mannooctulosonate into a precursor  
of lipid A in Salmonella typhimurium.  
J. Biol. Chem. 253, 1503 - 1511
  
111. Mutoh, N., H. Furukawa und S. Mizushima (1978)  
Role of lipopolysaccharide and outer membrane  
protein of Escherichia coli K12 in the receptor  
activity for bacteriophage T4.  
J. Bacteriol. 136, 693 - 699
  
112. Nackae, T., J. Ishii und M. Tokunaga (1979)  
Subunit structure of functional porine oligomers  
that permeability channels in the outer membrane  
of Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 254, 1457 - 1461

113. Nakae, T. und H. Nikaido (1975)  
Outer membrane as a diffusion barrier in  
Salmonella typhimurium: Penetration of oligo- and  
polysaccharides into isolated outer membrane  
vesicles and cells with degraded peptidoglycan  
layer.  
J. Biol. Chem. 250, 7359 - 7365
114. Nakamura, K. und S. Mizushima (1976)  
Effects of heating in dodecyl sulfate solution on  
the conformation and electrophoretic mobility of  
isolated major outer membrane proteins from  
Escherichia coli K-12.  
J. Biochem. 80, 1411 -1422
115. Neilands, J.B. (1982)  
Microbial envelope proteins related to iron.  
Annu. Rev. Microbiol. 36, 285 - 309
116. Nikaido, H. (1962)  
Studies on the biosynthesis of cell-wall  
polysaccharide in mutant strains of Salmonella.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 1337-1341
117. Nikaido, H. und T. Nakae (1979)  
The outer membrane of gram-negative bacteria.  
Adv. Microb. Physiol. 20, 163 - 250
118. Nixdorff, K., J. Gmeiner und H.H. Martin (1978)  
Interaction of lipopolysaccharide with detergents  
and its possible role in the detergent resistance  
of the outer membrane of gram-negative bacteria.  
Biochim. Biophys. Acta 510, 87 - 98
119. Nossal, N.G. und L.A. Heppel (1966)  
The release of enzymes by osmotic shock from  
Escherichia coli in exponential phase.  
J. Biol. Chem. 241, 3055 - 3062
120. Nurminen, M., K. Lounatmaa, M. Sarvas, P.H. Mäkelä  
und T. Nakae (1976)  
Bacteriophage-resistant mutants of Salmonella  
typhimurium deficient in two major outer membrane  
proteins.  
J. Bacteriol. 127, 941 - 955

121. Ohki, M. (1972)  
Correlation between metabolism of  
phosphatidylglycerol and membrane sythesis in  
Escherichia coli.  
J. Mol. Biol. 68, 249 - 264
  
122. Okuyama, H. und S.J. Wakil (1973)  
Positional specificities of acyl coenzyme A:  
glycerolphosphate and acyl coenzyme  
A:monoacylglycerolphosphate acyltransferases in  
Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 248, 5197 - 5205
  
123. Osborn, M.J. (1969)  
Structure and biosynthesis of the bacterial cell  
wall.  
Annu. Rev. Biochem. 38, 501 - 538
  
124. Osborn, M.J. und I.M. Weiner (1968)  
Biosynthesis of a bacterial lipopolysaccharide.  
VI. Mechanism of incorporation of abequeose into  
the O-antigen of Salmonella typhimurium.  
J. biol. Chem. 243, 2631 - 2639
  
125. Osborn, M.J. und R.Y. Tze-Yuen (1968)  
Biosynthesis of bacterial lipopolysaccaride. VII.  
Enzymatic formation of the first intermediate in  
biosynthesis of the O-antigen of Salmonella  
typhimurium.  
J. biol. Chem. 243, 5145 - 5152
  
126. Osborn, M.J., J.E. Gander und E. Parisi (1972)  
Mechanism of assembly of the outer membrane in  
Salmonella typhimurium. Site of sythesis of  
lipopolysaccharide.  
J. Biol. Chem. 247, 3973 - 3986
  
127. Osborn, M.J., J.E. Gander, E. Parisi und J. Carson  
(1972)  
Mechanism of assembly of the outer membrane of  
Salmonella typhimurium. Isolation and  
characterization of cytoplasmic and outer  
membrane.  
J. Biol. Chem. 247, 3962 - 3972

128. Osborn, M.J., P.D. Rick, V. Lehmann, E. Rupprecht und M. Singh (1974)  
Structure and biogenesis of the cell envelope of gram-negative bacteria.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 52 - 65
129. Osborn, M.J., S.M. Rosen, L. Rothfield, L.D. Zeleznick und B.L. Horecker (1964)  
Lipopolysaccharide of the gram-negative cell wall. Biosynthesis of a complex heteropolysaccharide occurs by successive addition of specific sugar residues.  
Science 145, 783 - 789
130. Overath, P., G. Pauli und H.U. Schairer (1969)  
Fatty acid degradation in Escherichia coli: an inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants.  
Eur. J. Biochem. 7, 559 - 575
131. Overath, P., M. Brenner, T. Gulik-Krzywicki, E. Shechter und L. Letellier (1975)  
Lipid phase transition in cytoplasmic and outer membranes of Escherichia coli.  
Biochim. Biophys. Acta 389, 358 - 369
132. Owen, P. und M.R.J. Salton (1975)  
Antigenic and enzymatic architecture of Micrococcus lysodeikticus membranes established by crossed immunoelectrophoresis.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3711 - 3715
133. Patterson-Delafield, J., R.J. Martinez und R.I. Lehrer (1980)  
Microbicidal cationic proteins in rabbit alveolar macrophages: a potential host defence mechanism.  
Infect. Immun. 30, 180 - 192
134. Pugsley, A.P. und C. Schnaitman (1978)  
Outer membrane proteins of Escherichia coli. VII. Evidence that bacteriophage-directed protein 2 functions as a porin.  
J. Bacteriol. 133, 1181 - 1189
135. Raetz, C.R.H. (1978)  
Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in Escherichia coli.  
Microbiol. Rev. 42, 614 - 659

136. Raetz, C.R.H. und E.P. Kennedy (1972)  
The association of phosphatidylserine synthetase with ribosomes in extracts of Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 247, 2008 - 2014
137. Raetz, C.R.H. und E.P. Kennedy (1973)  
Function of cytidine diphosphate-diglyceride and deoxycytidine diphosphate-diglyceride in the biosynthesis of membrane lipids in Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 248, 1098 - 1105
138. Ray, T.K. und J.E. Cronan (1976)  
Activation of long chain fatty acids with acyl carrier protein: demonstration of a new enzyme, acyl-acyl carrier protein synthetase, in Escherichia coli.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4374 - 4378
139. Ray, T.K. und J.E. Cronan (1976)  
Mechanism of phospholipid biosynthesis in Escherichia coli: acyl CoA synthetase is not required for the incorporation of intracellular free fatty acids into phospholipid.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 506 - 513
140. Ray, T.K., J.E. Cronan, R.D. Mavis und P.R. Vagelos (1970)  
The specific acylation of glycerol 3-phosphate to monoacylglycerol 3-phosphate in Escherichia coli: evidence for a single enzyme conferring this specificity.  
J. Biol. Chem. 245, 6442 - 6448
141. Rest, R.F., M.H. Cooney und J.K. Spitznagel (1977)  
Susceptibility of lipopolysaccharide mutants to the bactericidal action of human neutrophil lysosomal fractions.  
Infect. Immun. 16, 145 - 151
142. Richmond, M.H. und N.H.C. Curtis (1974)  
The interplay of  $\beta$ -lactamase and intrinsic factors in the resistance of gram-negative bacteria to penicillins and cephalosporins.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 553 - 568

143. Rick, P.D., L.M. Fung, C. Ho und M.J. Osborn (1977)  
Lipid A mutants of Salmonella typhimurium.  
Purification and chracterisation of a lipid A  
precursor produced by a mutant in 3-deoxy-D-  
mannooctulosonate-8-phosphate synthetase.  
J. Biol. Chem. 252, 4904 - 4912
144. Rietschel, E.T. und O. Lüderitz (1980)  
Struktur von Lipopolysaccharid und Taxonomie  
Gram-negativer Bakterien.  
Forum Mikrobiologie Heft 1, 12 - 20
145. Risse, H.J., O. Lüderitz und O. Westphal (1967)  
Vergleichende Untersuchungen zur Biosynthese von  
Nucleotid-Zuckern in S- und R-Formen von  
Salmonella minnesota und Salmonella riuir.  
Eur. J. Biochem. 1, 233 - 242
146. Robbins, P.W., D. Bray, M. Dankert und A. Wright  
(1967)  
Direction of chain growth in polysaccharide  
sythesis. Work on a bacterial polysaccharide  
suggests that elongation can occur at the  
"reducing" end of growing chains.  
Science 158, 1536 - 1542
147. Rodriguez-Tébar, A., J.A. Barbas und D. Vazquez  
(1983)  
Distribution of penicillin-binding proteins  
within the cell envelope of Escherichia coli.  
In: The target of penicillin, 427 - 432  
Herausgeber: R. Hakenbeck, J.V. Høltje und H.  
Labischinski, Walter de Gruyter & Co., Berlin
148. Rottem, S. und L. Leive (1977)  
Effect of variations in lipopolysaccharide on the  
fluidity of the outer membrane of Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 252, 2077 - 2081
149. Rottem, S., M. Hasin und S. Razin (1975)  
The outer membrane of Proteus mirabilis. II. The  
extractable lipid fraction and electron-  
paramagnetic resonance analysis of the outer and  
cytoplasmic membranes.  
Biochim. Biophys. Acta 375, 395 - 405

150. Rundell, K. und C.W. Shuster (1973)  
Membrane associated nucleotide sugar reactions.  
I. Properties of the first enzyme of O-antigene  
synthesis.  
J. biol. Chem. 248, 5436 - 5442
151. Ryter, A. (1974)  
Comparaison entre le mode d'incorporation du DAP  
dans la muréine et l'insertion du récepteur du  
phage lambda dans la membrane externe de  
Escherichia coli.  
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 125B, 167 - 180
152. Ryter, A., H. Schuman und M. Schwarz (1975)  
Integration of the receptor for bacteriophage  
lambda in the outer membrane of Escherichia coli:  
Coupling with cell division.  
J. Bacteriol. 122, 295 - 301
153. Sackman, E.H., H. Trauble, H.J. Galla und P. Overath  
(1973)  
Lateral diffusion, protein mobility, and phase  
transition in Escherichia coli membranes. A spin  
label study.  
Biochemistry 12, 5360 - 5369
154. Salton, M.R.J. und R.W. Horne (1951)  
Studies of the bacterial cell wall. II. Methods  
of pereparation and some properties of cell  
walls.  
Biochim. Biophys. Acta 7, 177 - 197
155. Schleifer, K.H. und . O. Kandler (1972)  
Peptidoglycan types of bacterial cell walls and  
their taxonomic implications.  
Bacteriol Rev. 36, 407 - 477

156. Schleifer, K.H. und P.H. Seidl (1985)  
In: Chemical methods in bacterial systematics,  
201 - 220  
Herausgeber: M. Goodfellow, D.E. Minnikin  
Academic Press, London
157. Schnaitman, C.A. (1970)  
Protein composition of the cell wall and  
cytoplasmic membrane of Escherichia coli.  
J. Bacteriol. 104, 890 - 901
158. Schulman, H. und E.P. Kennedy (1977)  
Relation of turnover of membrane phospholipids to  
synthesis of membrane-derived oligosaccharides of  
Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 252, 4250 - 4255
159. Schulman, H. und E.P. Kennedy (1977)  
Identification of UDP-glucose as an intermediate  
in the biosynthesis of the membrane-derived  
oligosaccharides of Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 252, 6299 - 6303
160. Schweizer, M. und U. Henning (1977)  
Action of a major outer cell envelope membrane  
protein in conjugation of Escherichia coli K-12.  
J. Bacteriol. 129, 1651 - 1652
161. Schweizer, M., I. Hindennach, W. Garten und U.  
Henning (1978)  
Major proteins of the Escherichia coli outer cell  
envelope membrane. Interaction of protein II\*  
with lipopolysaccharide.  
Eur. J. Biochem. 82, 211 - 217
162. Sekizawa, J. und S. Fukui (1973)  
Isolation, solubilization and reaggregation of  
outer membrane of Escherichia coli.  
Biochim. Biophys. Acta 307, 104 - 117
163. Short, S.A., H.R. Kaback und L.D. Kohn (1975)  
Localization of D-lactate dehydrogenase in native  
and reconstituted Escherichia coli membrane  
vesicles.  
J. Biol. Chem. 250, 4291 - 4296

164. Silbert, D.F. (1975)  
Genetic modification of membrane lipid.  
Annu. Rev. Biochem. 44, 315 - 339
165. Singer, S.J. und G.L. Nicolson (1972)  
The fluid mosaic model of the structure of cell  
membranes.  
Science 175, 720 - 730
166. Skurray, R.A., R.E.W. Hancock und P. Reeves (1974)  
Con<sup>-</sup> mutants: class of mutants in Escherichia coli K-12 lacking a major cell wall protein and defective in conjugation and adsorption of a bacteriophage.  
J. Bacteriol. 119, 726 - 735
167. Smit, J., Y. Kamio und H. Nikaido (1975)  
Outer membrane of Salmonella typhimurium:  
chemical analysis and freeze-fracture studies  
with lipopolysaccharide mutants.  
J. Bacteriol. 124, 942 - 958
168. Smit, M. und H. Nikaido (1978)  
Outer membrane of gram-negative bacteria. XVIII.  
Electron microscopic studies on porin insertion  
sites and growth of cell surface of Salmonella typhimurium.  
J. Bacteriol. 135, 687 - 702
169. Smith, R.J.M. und C. Green (1974)  
The rate of cholesterol flip-flop in lipid  
bilayers and its relation to membrane sterol  
pools.  
FEBS Letts 42, 108 - 111
170. Stock, J.B., B. Rauch und S. Roseman (1977)  
Periplasmic space in Salmonella typhimurium and  
Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 252, 7850 - 7861

171. Sutcliffe, J., R. Blumenthal, A. Walter und J. Foulds (1983)  
Escherichia coli outer membrane protein K is a porin.  
J. Bacteriol. 156, 867 - 872
172. Symelcman, S. und M. Hofnung (1975)  
Maltose transport in Escherichia coli K-12:  
involvement of the bacteriophage lambda receptor.  
J. Bacteriol. 124, 112 - 118
173. Takeuchi, Y. und H. Nikaido (1981)  
Persistence of segregated phospholipid domains in phospholipid-lipopolysaccharide mixed bilayers: studies with spin-labeled phospholipids.  
Biochemistry 20, 523 - 529
174. Tsukagoshi, N. und C.F. Fox (1971)  
Hybridization of membranes by sonic irradiation.  
Biochem. 10, 3309 - 3313
175. Tunaitis, E. und J.E. Cronan (1973)  
Characterization of the cardiolipin synthetase activity of Escherichia coli envelopes.  
Arch. Biochem. Biophys. 155, 420 - 427
176. Vaara, M. und H. Nikaido (1984)  
Molecular organization of bacterial outer membrane.  
In: Chemistry of endotoxin, 1 - 45  
Herausgeber: E.T. Rietschel, Elsevier, Amsterdam.
177. Van Alphen, L., B. Lugtenberg, E.T. Rietschel und C. Mombers (1979)  
Architecture of the outer membrane of Escherichia coli K12. Phase transitions of the bacteriophage K3 receptor complex.  
Eur. J. Biochem. 101, 571 - 579
178. Van Alphen, L., L. Havekes und B. Lugtenberg (1977)  
Major outer membrane protein d of Escherichia coli K12. Purification and in vitro activity of bacteriophage K3 and f-pilus mediated conjugation.  
FEBS Lett. 75, 285 - 290

179. Van den Bosch, h. und P.R. Vagelos (1970)  
Fatty acyl-CoA and fatty acyl-acyl carrier protein as acyl donors in the synthesis of lysophosphatidate and phosphatidate in Escherichia coli.  
Biochim. Biophys. Acta 218, 233 - 248
180. Van den Bosch, H., J.R. Williamson und P.R. Vagelos (1970)  
Localization of acyl carrier protein in Escherichia coli.  
Nature 228, 338 - 341
181. Van Golde, L.M.G., H. Schulman und E.P. Kennedy (1973)  
Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in Escherichia coli.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1368 - 1372
182. Volpe, J.J. und P.R. Vagelos (1976)  
Mechanisms and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids.  
Physiol. Rev. 56, 339 - 417
183. Wallach, D.F.H. und V.B. Kamat (1966)  
Preparation of plasma-membrane fragments from mouse ascites tumor cells.  
Meth. Enzymol. 8, 164 - 172
184. Walter, P. und G. Blobel (1981)  
Translocation of proteins across the endoplasmic retikulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein.  
J. Cell Biol. 91, 551 - 556
185. Walter, P. und G. Blobel (1981)  
Translocation of proteins across the endoplasmic retikulum. III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes.  
J. Cell Biol. 91, 557 - 561

186. Ward, J.B. (1973)  
The chain length of the glycan in bacterial cell walls.  
Biochem. J. 133, 395 - 398
187. Weiner, I.M., T. Higuchi, L. Rothfield, M. Saltmarsh-Andrew, M.J. Osborn und B.L. Horecker (1965)  
Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide. V. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of the O-antigen groups of Salmonella typhimurium.  
Proc. Natn. Acad. Sci. USA 54, 228 - 235
188. Weiner, I.M., T. Higuchi, M.J. Osborn und B.L. Horecker (1966)  
Biosynthesis of O-antigen in Salmonella typhimurium.  
Ann N.Y. Acad. Sci. 166, 391 - 404
189. Westphal, O. und K. Jann (1965)  
Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol water and further applications of the procedure.  
Methods Carbohydr. Chem. 5, 83
190. White, D.A., F.A. Albright, W.J. Lennarz und C.A. Schnaitman (1971)  
Distribution of phospholipid-synthesizing enzymes in the wall and membrane subfractions of the envelope of Escherichia coli.  
Biochim. Biophys. Acta 249, 636 - 642
191. Wickner, W. (1979)  
The assembly of proteins into biological membranes: the membrane trigger hypothesis.  
Annu. Rev. Biochem. 48, 23 - 45
192. Wickner, W. (1980)  
Assembly of proteins into membranes.  
Science 210, 861 - 86

193. Wright, A., M. Dankert und P.W. Robbins (1965)  
Evidence for an intermediate stage in the  
biosynthesis of the Salmonella O-antigen.  
Proc. Natn. Acad. Sci. USA 54, 235 - 241
194. Wright, A., M. Dankert, P. Fennessey und P.W.  
Robbins (1967)  
Characterization of a polyisoprenoid compound  
functional in O-antigen biosynthesis.  
Proc. Natn. Acad. Sci. USA 57, 1798 - 1803
195. Yamada, H. und S. Mizushima (1980)  
Interaction between major outer membrane protein  
(O-8) and lipopolysaccharide in Escherichia coli  
K12.  
Eur. J. Biochem. 103, 209 - 218
196. Zwaig, N. und E.C.C. Lin (1966)  
Feedback inhibition of glycerol kinase, a  
catabolic enzyme in Escherichia coli.  
Science 153, 755 - 757
197. Zwaig, N., W.S. Kistler und E.C.C. Lin (1970)  
Glycerol kinase, the pacemaker for the  
dessimilation of glycerol in Escherichia coli.  
J. Bacteriol. 102, 753 - 759



## Lebenslauf

- 10.03.1956      Geboren in Rhade, als drittes Kind des  
Landwirtes Wilhelm Leying und seiner Ehefrau  
Theresia, geb. Ellermeyer
- 1963 - 1970      Volksschule Rhade
- 1970 - 1971      Hauptschule Lembeck
- 1971 - 1972      10. Schuljahr, Hauptschule Dorsten
- 1972 - 1975      St. Ursula-Gymnasium Dorsten
- 1975              Abitur
- 1975 - 1976      Wehrdienst in Ahlen
- 1976 - 1979      Studium der Mathematik an der Westfälischen  
Wilhelms-Universität in Münster
- 1979 - 1984      Studium der Biologie an der Ruhr-Universität
- 6.12.1984      Diplomhauptprüfung in Biologie  
Hauptfach: Botanik  
1. Nebenfach: Mikrobiologie  
2. Nebenfach: Immunologie  
Thema der Diplomarbeit: "Der Einfluß  
subinhibitorischer Konzentrationen von  $\beta$ -  
Laktam-Antibiotika auf die Zellhülle von  
Escherichia coli O7:K1:H6"
- Januar 1985      Beginn der Promotion am Lehrstuhl für  
Medizinische Mikrobiologie und Immunologie  
an der Ruhr-Universität Bochum unter Leitung  
von Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch









